

Université de Montréal

Rôle de la GTPase ARF6 dans la prolifération cellulaire

par Mohamed BOURMOUM

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de PhD
en pharmacologie

Octobre 2017

© Mohamed BOURMOUM, 2017

Résumé

Bien qu'elle soit vitale en conditions physiologiques, la prolifération cellulaire pourrait contribuer à la genèse et la progression de maladies graves telles que l'athérosclérose et le cancer. Dans cette étude, nous démontrons que la GTPase ARF6, connue principalement pour son rôle dans l'endocytose, le trafic membrane plasmique-endosomes et le remodelage de l'actine, contrôle la prolifération cellulaire à deux niveaux différents du cycle cellulaire soit le début de la phase G1 et la mitose. D'abord, dans un contexte cardiovasculaire, nous rapportons qu'ARF6 contrôle la production des ROS induite par l'AngII en régulant positivement l'activation de la GTPase Rac1 et l'expression de la NADPH oxydase NOX1. Les ROS agissent comme médiateurs pour favoriser la transactivation de l'EGFR et l'activation des MAP Kinases ERK1/2, p38MAPK et JNK1/2 induisant l'expression des gènes nécessaires à la transition G1/S et la prolifération. Ensuite, nous montrons qu'ARF6 joue un rôle important dans la dernière phase du cycle cellulaire, la mitose. En effet, ARF6 est nécessaire pour la stabilité des fibres-K et le bon positionnement des chromosomes au niveau de la plaque de métaphase, ce qui permet la satisfaction du SAC, l'ubiquitination de la cycline B, sa dégradation et la ségrégation chromosomique (l'anaphase). Finalement, en étudiant la voie mTOR dans les cellules déplétées en ARF6, nous avons identifié une nouvelle régulation de cette voie durant la mitose. Nous démontrons que les kinases p85S6K1 et S6K2 s'activent d'une manière dépendante de CDK1 pour phosphoryler la protéine ribosomale S6 durant la mitose.

Mots-clés: Prolifération, ARF6, ROS, mitose, métaphase, microtubules, kinétochores, mTOR, CDK1.

Abstract

Although it is vital in normal physiological conditions, cell proliferation, when poorly controlled, could contribute to the pathogenesis and progression of serious diseases such as atherosclerosis and cancer. In this study, we demonstrate that the GTPase ARF6, classically known for its role in endocytosis, plasma membrane-endosomal trafficking and actin remodeling, controls cell proliferation at two different levels of the cell cycle, G1 phase and mitosis. First, in a cardiovascular context, we show that ARF6 controls AngII-induced ROS production by positively regulating Rac1 activation and NOX1 expression. ROS act as mediators to promote the transactivation of EGFR and the activation of the three MAP Kinases ERK1/2, p38MAPK and JNK1/2 inducing the expression of genes required for G1/S transition and proliferation. Second, we show that ARF6 plays an important role in the last phase of the cell cycle, mitosis. Indeed, ARF6 is required for the stability of microtubules (K-fibres) and the proper positioning of chromosomes at the metaphase plate allowing SAC satisfaction, triggering of cyclin B ubiquitination, its degradation and chromosomal segregation (anaphase). Finally, by studying the mTOR pathway in ARF6 depleted cells, we characterized a new regulation of this pathway during mitosis. We demonstrate that the kinases p85S6K1 and S6K2 are activated in a CDK1-dependent manner to phosphorylate the ribosomal protein S6 during mitosis.

Keywords: Proliferation, ARF6, ROS, mitosis, metaphase, microtubules, kinetochores, mTOR, CDK1.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles	x
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
1. La prolifération cellulaire dans la physiopathologie cardiovasculaire	1
2. Les modulateurs de la prolifération.....	6
2.1. La voie des récepteurs couplés aux protéines G.....	6
2.2. La voie des récepteurs tyrosine kinase	13
2.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	18
2.4. Les petites GTPases de la superfamille Ras.....	22
2.5. La voie des MAP Kinases (MAPKs).....	33
2.6. La voie mTOR.....	38
3. Le cycle cellulaire	45
3.1. Les CDKs et les cyclines	45
3.2. La transition G1/S.....	47
3.3. La transition G2/M	48
3.4. La mitose.....	49
3.5. Les kinases mitotiques	51
3.6. Le système de contrôle du fuseau mitotique (SAC)	56
3.7. L'ubiquitination et la mitose.....	60
4. Hypothèse et objectifs	65

Chapitre 1. The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation.....	66
1.1. Abstract.....	67
1.2. Introduction.....	67
1.3. Materials and Methods.....	70
1.3.1. Reagents	70
1.3.2. Cell culture, transfection and lentiviral transduction.....	70
1.3.3. Western blotting	71
1.3.4. GTPases activation assays.....	71
1.3.5. ROS measurement	72
1.3.6. RNA extraction and quantification.....	72
1.3.7. Cell counting, cell viability and MTT assays.....	73
1.3.8. Statistical analysis.....	73
1.4. Results.....	74
1.4.1. ARF6 controls Ang II-induced Rac1 activation.....	74
1.4.2. Ang II-induced superoxide anion production is ARF6-dependent.....	74
1.4.3. ARF6 regulates Nox1 expression	75
1.4.4. ARF6 mediates the ROS-dependent EGFR transactivation.....	76
1.4.5. ARF6 is required for the activation of ROS sensitive MAPK and proliferation.....	77
1.5. Discussion	78
1.6. Fig legends	81
1.6.1. Fig 1. ARF6 controls Ang II-induced Rac1 activation.....	81
1.6.2. Fig 2. Ang II-induced superoxide anion production is ARF6 dependent	81
1.6.3. Fig 3. ARF6 regulates Nox1 expression	82
1.6.4. Fig 4. ARF6 mediates ROS-dependent EGFR transactivation	82
1.6.5. Fig 5. ARF6 is required for the activation of the ROS sensitive Erk1/2, p38 and Jnk.....	83
1.6.6. Fig 6. ARF6 mediates Ang II induced cellular proliferation through ROS	83
1.6.7. Fig 7. Schematic representation of the molecular mechanism by which ARF6 mediates Ang II promoted ROS generation and proliferation of VSMC	84

1.7. References.....	92
Chapitre 2. ADP-ribosylation factor 6 is required for the metaphase/anaphase transition and its knockdown reveals new regulation of the ribosomal protein S6 during mitosis.....	98
2.1. Abstract.....	99
2.2. Introduction.....	100
2.3. Materials and methods.....	101
2.3.1. Reagents, antibodies and shRNAs.....	101
2.3.2. Cell culture and lentiviral transduction.....	102
2.3.3. Western blot	103
2.3.4. GST pulldown assay	103
2.3.5. Immunoprecipitation.....	103
2.3.6. Cell cycle, cell size and proliferation.....	104
2.3.7. Proteasome activity.....	104
2.3.8. Fluorescence, live cell and confocal microscopy:	105
2.3.9. Statistical analysis.....	106
2.4. Results.....	106
2.4.1. Knockdown of ARF6 delays/blocks cells at mitosis	106
2.4.2. ARF6 mediates the metaphase/anaphase transition.....	107
2.4.3. ARF6 is needed for cyclin B but not cyclin A degradation	108
2.4.4. ARF6 depletion alters chromosomes attachments to microtubules and their architecture at the metaphase plate.....	110
2.4.5. ARF6 depletion differently regulates the activity of mTOR pathway downstream components	111
2.4.6. S6, p85S6K1 and p54S6K2 are activated at mitosis	111
2.4.7. S6, p85S6K1 and p54S6K2 activation is CDK1-dependent	112
2.5. Discussion	113
2.6. Figure legends	119
2.6.1. Figure 1. ARF6 depletion delays/blocks cells at mitosis	119
2.6.2. Figure 2. ARF6 mediates the metaphase/anaphase transition.....	119

2.6.3. Figure 3. Cyclin B but not cyclin A degradation requires ARF6 and ARF6 is activated at metaphase	120
2.6.4. Figure 4. ARF6 depletion reduces cyclin B ubiquitination without affecting proteasome activity.....	121
2.6.5. Figure 5. ARF6 depletion affects chromosomes positioning and attachments to microtubules at the metaphase plate.....	121
2.6.6. Figure 6. ARF6 depletion differently regulates mTOR pathway downstream components	122
2.6.7. Figure 7. S6, p85S6K1 and p54S6K2 are activated during mitosis	122
2.6.8. Figure 8. S6, p85S6K1 and p54S6K2 mitotic activation is CDK1-dependent	122
2.6.9. Figure S1. ARF6 depletion increases average cell size and decreases proliferation rate	122
2.6.10. Figure S2. (related to Figure 8). The implication of mTORC1 in S6, p85S6K1 and p54S6K2 activation	123
2.7. References	134
Discussion.....	137
Conclusion	153
Bibliographie	154

Liste des tableaux

Tableau I. Les GEFs (A) et les GAPs (B) des protéines ARF	28
---	----

Liste des figures

Figure 1.	Régulation du phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires(CMLVs) ...	2
Figure 2.	La pathogenèse de l'athérosclérose	4
Figure 3.	Les RCPGs, les protéines G et les β -arrestines	8
Figure 4.	La signalisation de l'AngII dans la prolifération et la survie des CMLVs	11
Figure 5.	La famille ErbB des récepteurs RTKs	15
Figure 6.	La transactivation de l'EGFR par les RCPGs	17
Figure 7.	L'homéostasie des ROS.....	19
Figure 8.	Les Protéines ARFs: structure et régulation.....	24
Figure 9.	Rôle d'ARF6 dans l'endocytose et le recyclage des endosomes.....	29
Figure 10.	La cascade des MAP Kinases	38
Figure 11.	La signalisation mTOR	44
Figure 12.	CDKs, cyclines et le cycle cellulaire	47
Figure 13.	Les phases de la mitose.....	50
Figure 14.	Aurora B et le modèle de tension centromérique	54
Figure 15.	Le système de surveillance du fuseau mitotique (SAC).....	59
Figure 16.	Le complexe APC/C.....	61
Figure 17.	ARF6 controls Ang II-induced Rac1 activation.....	85
Figure 18.	Ang II-induced superoxide anion production is ARF6 dependent.....	86
Figure 19.	ARF6 regulates Nox1 expression.....	87
Figure 20.	ARF6 mediates ROS-dependent EGFR transactivation.....	88
Figure 21.	ARF6 is required for the activation of the ROS sensitive Erk1/2, p38 and Jnk ...	89
Figure 22.	ARF6 mediates Ang II induced cellular proliferation through ROS.....	90
Figure 23.	Schematic representation of the molecular mechanism by which ARF6 mediates Ang II promoted ROS generation and proliferation of VSMC	91
Figure 24.	ARF6 depletion delays/blocks cells at mitosis	124
Figure 25.	ARF6 mediates the metaphase/anaphase transition	125
Figure 26.	Cyclin B but not cyclin A degradation requires ARF6 and ARF6 is activated at metaphase.....	126

Figure 27. ARF6 depletion reduces cyclin B ubiquitination without affecting proteasome activity.....	127
Figure 28. ARF6 depletion affects chromosomes positioning and attachments to microtubules at the metaphase plate	128
Figure 29. ARF6 depletion differently regulates mTOR pathway downstream components	129
Figure 30. S6, p85S6K1 and p54S6K2 are activated during mitosis.....	130
Figure 31. S6, p85S6K1 and p54S6K2 mitotic activation is CDK1-dependent.....	131
Figure 32. ARF6 depletion increases average cell size and decreases proliferation rate.....	132
Figure 33. The implication of mTORC1 in S6, p85S6K1 and p54S6K2 activation.....	133
Figure 34. Modèle du rôle d'ARF6 dans la mitose.....	147

Liste des sigles

4EBP1: *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*

ADAM: *A disintegrin and metalloproteinase*

AKT: *Protein kinase B*

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

AngII: *Angioensin II*

AP1: *Activator protein 1*

APC/C: *Anaphase-promoting complex/cyclosome*

ApoE: *Apolipoprotein E*

ARF: *ADP-ribosylation factor*

ARFGAP: *ARF GTPase-activating protein*

ARFGEF: *ARF guanine exchange factor*

Arp2/3: *Actin-related proteins 2/3*

ASAP: *ARFGAP containing SH3, ankyrin repeat and PH domains*

ASK: *Apoptosis signal-regulating kinase*

AT1: *Angiotensin II receptor type 1*

AT2: *Angiotensin II receptor type 2*

ATP: *Adenosine triphosphate*

BAD: *Bcl-2-associated death promoter*

Bcl2: *B-cell lymphoma 2*

bFGF: *Basic fibroblast growth factor*

BUB: *Budding uninhibited by benzimidazoles*

BUBR1: *Budding uninhibited by benzimidazole-related 1*

Ca²⁺: Calcium

CAK: *CDK-activating kinase*

Cav-1: *Caveolin-1*

CDC20: *Cell division cycle protein 20*

Cdc25: *Cell division cycle 25*

Cdc42: *Cell division control protein 42 homolog*
 CDH1: *CDC20 homolog 1*
 CDK: *Cyclin-dependent kinase*
 CKI: *Cyclin-dependent kinase inhibitor*
 CMLV: *Cellule musculaire lisse vasculaire*
 CPC: *Chromosomal passenger complex*
 DAG: *Diacylglycérol*
 DOCK: *Dedicator of cytokinesis*
 DPI: *Diphenyleneiodonium*
 DUOX: *Dual oxydase*
 ECT2: *Epithelial cell transforming 2*
 Eg5: *kinesin-5*
 EGF: *Epidermal growth factor*
 EGFR: *Epidermal growth factor receptor*
 eIF: *Eukaryotic initiation factor*
 Elk-1: *ETS domain-containing protein Elk-1*
 ELMO: *Engulfment and cell motility protein*
 Emi1: *Early mitotic inhibitor 1*
 Erb B: *Avian erythroblastosis oncogene B*
 ERK1/2: *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*
 ET1: *Endothelin 1*
 FAK: *Focal adhesion kinase*
 GAP: *GTPase activating protein*
 GDI: *Guanosine nucleotide dissociation inhibitor*
 GDP: *Guanosine diphosphate*
 GEF: *Guanine exchange factor*
 GGA3: *Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein 3*
 GIT1: *G protein-coupled receptor kinase interactor 1*
 GPCR: *G protein-coupled receptor*
 Grb2: *Growth factor receptor-binding protein 2*
 GRK: *G protein-coupled receptor kinase*

GSK3 β : *Glycogen synthase kinase 3 β*
 GTP: *Guanosine triphosphate*
 HB-EGF: *Heparin-binding EGF-like growth factor*
 IGF-1: *Insuline-like growth factor 1*
 IL-6: *Interleukin 6*
 INCENP: *Inner centromere protein*
 IP3: *Inositol trisphosphate*
 IQGAP: *IQ motif containing GTPase activating protein 1*
 JAK: *Janus kinase*
 JNK: *c-Jun N-terminal kinase*
 KLHL: *Kelch like family member*
 KNL1: *Kinetochore scaffold 1*
 LDL: *Low-density lipoprotein*
 LIMK: *LIM domain kinase*
 MAD (1/2): *Mitotic arrest deficient (1/2)*
 Maf1: *Negative regulator of RNA polymerase III*
 MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
 MAPKAPK: *MAPK-activated protein kinase*
 MCAK: *Mitotic centromere-associated kinesin*
 MCC: *Mitotic checkpoint complex*
 MDCK: *Madin Darby canine kidney*
 MEK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*
 MgcRacGAP: *Male germ cell RacGAP*
 MKLP1: *Mitotic kinesin-like protein 1*
 MNK: *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase*
 MPS1: *monopolar spindle 1*
 mTOR: *Mammalian target of rapamycin*
 mTORC: *Mammalian target of rapamycin complex*
 Myt1: *Membrane associated tyrosine/threonine 1*
 NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
 NDC80: *NDC80, kinetochore complex component*

NGF: *Nerve growth factor*
 NO: *Nitric oxide*
 NOX: *NADPH oxidase*
 Noxa1: *NADPH oxidase activator 1*
 Noxo1: *NADPH oxidase organizer 1*
 NUF2: *Kinetochore protein Nuf2*
 OP18: *Oncoprotein 18*
 p38MAPK: *P38 mitogen-activated protein kinase*
 PA: *Phosphatidic acid*
 PAK: *p21-activated kinase*
 PAR6: *Partitioning-defective 6*
 PBD: *Polo box domain*
 PDGF: *Platelet derived growth factor*
 PI3K: *Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase*
 PIX: *PAK-interacting exchange factor*
 PKA: *Protein kinase A*
 PKC: *Protein kinase C*
 PLA2: *Phospholipase A2*
 PLC: *Phospholipase C*
 PLD: *Phospholipase D*
 PLK: *Polo-like kinase*
 PP1: *Protein phosphatase 1*
 PP2A: *Protein phosphatase 2A*
 PRAS40: *Proline-rich Akt substrate of 40 kDa*
 PTB: *Phosphotyrosine binding domain*
 PTP: *Protein tyrosine phosphatase*
 PYK2: *Proline-rich tyrosine kinase 2*
 Rac1: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
 Raf: *Rapidly accelerated fibrosarcoma kinase*
 Ran: *Ras-related nuclear protein*
 Ras: *Rat sarcoma protein*

RCPG: Récepteur couplé aux protéines G
 Rheb: *Ras homolog enriched in brain*
 RhoA: *Ras homolog gene family, member A*
 ROCK: *Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1*
 ROS: *Reactive oxygen species*
 RSK1: *Ribosomal protein S6 kinase alpha-1*
 RTK: *Receptor tyrosine kinase*
 S6K: *Ribosomal S6 kinase*
 SAC: *Spindle assembly checkpoint*
 Sar1: *Secretion associated Ras related GTPase 1*
 SH2: *Src homology-2 domain*
 Shc: *SH2-containing protein*
 SOD: *Superoxide dismutase*
 SOS: *Son of sevenless*
 Src: *Src proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*
 STAT: *Signal transducer and activator of transcription*
 Syk: *Spleen associated tyrosine kinase*
 TGF- α : *Transforming growth factor alpha*
 TIF-1A: *Transcriptional intermediary factor 1A*
 TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*
 TRAF: *TNF receptor associated factor*
 TSC (1/2): *Tuberous sclerosis (1/2)*
 UBASH3B: *Ubiquitin associated and SH3 domain containing B*
 UV: Ultraviolet
 VEGF: *Vascular endothelial growth factor*
 VSMC: *Vascular smooth muscle cell*
 Wave: *Wiskott-Aldrich syndrome protein family member*

*Je dédie cette thèse à mes chers parents, à mes belles filles Neyla et Sana et à la femme que
j'aime Meriouma.*

Remerciements

D'abord, je tiens à remercier ma directrice de recherche. Merci Audrey de m'avoir donné l'énorme opportunité de m'épanouir dans ton laboratoire. Merci pour ton coaching extraordinaire, ta confiance en moi m'a toujours inspiré à travailler passionnément, loin de toute pression. Ta porte a toujours été ouverte et tu étais toujours disponible pour discuter et m'aider. Une chose est certaine, si un jour j'aurai à gérer mon propre laboratoire, j'ai le meilleur exemple à suivre.

Ensuite, j'aimerais remercier tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Merci Ricardo d'être non seulement un bon collègue, mais aussi un bon ami et un complice. J'espérais te voir au moins une fois énervé, mais mon rêve ne s'est jamais réalisé. Merci Eric de tes conseils précieux pendant mes débuts au lab, merci d'avoir toujours créé la bonne ambiance avec tes blagues parfois racistes, mais drôles. Merci Shirley de ta disponibilité et ton aide tout au long de mon doctorat, tu savais toujours comment nous imposer les règles avec le grand sourire.

Enfin, je remercie mon épouse que j'aime. Merci Meriouma d'avoir été très patiente avec moi pendant la rédaction de cette thèse, merci de supporter mon absence et je te promets de revenir fort à mes des tâches oubliées (la vaisselle, les couches de bébé, etc.) dès que possible. Merci à toi ma petite Neyla de créer le bonheur dans notre vie et le désordre dans notre salon. Je remercie toute ma famille, mes frères, mes sœurs et surtout mes parents qui pensent toujours à moi malgré les longues distances, leurs invocations me sont toujours utiles.

Introduction

1. La prolifération cellulaire dans la physiopathologie cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est vital pour le fonctionnement de tous les autres systèmes du corps. Le cœur propulse le sang riche en oxygène et en nutriments dans les artères qui l'acheminent à tous les tissus de l'organisme. Les capillaires permettent ensuite les échanges entre le sang et les cellules grâce à leur paroi extrêmement fine. Le sang chargé en déchets et en dioxyde de carbone est ensuite réacheminé vers le cœur par les veines.

La paroi vasculaire est formée de trois couches. De l'extérieur vers l'intérieur, ces couches sont: l'adventice, composée de tissus conjonctifs et de fibres élastiques; la media, composée de collagène et des cellules musculaires lisses vasculaires(CMLVs) et l'intima, formée principalement d'une monocouche de cellules endothéliales, appelées endothélium.

Les cellules musculaires lisses vasculaires jouissent d'une remarquable plasticité et peuvent changer de phénotype en réponse aux différentes conditions physiologiques et pathologiques. Deux principaux phénotypes existent avec deux différents types de morphologie et fonction: le phénotype contractile et le phénotype synthétique (**Fig 1**). Dans les conditions normales, les CMLVs sont quiescentes. Elles ont un phénotype contractile très peu prolifératif et une forme étirée; leur capacité de contraction et de relaxation en réponse aux stimuli nerveux et hormonaux permet de réguler le diamètre des vaisseaux pour maintenir une bonne pression sanguine.

La prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires est un processus indispensable dans des conditions physiologiques qui nécessitent un remodelage vasculaire, telles que la grossesse et l'exercice physique ainsi qu'en cas de lésions vasculaires. Dans ces conditions, les CMLVs balancent vers un phénotype synthétique prolifératif. Elles ont une morphologie épithélioïde, synthétisent et sécrètent de grandes quantités de composantes de la matrice extracellulaire et elles ont une grande capacité migratoire et proliférative (Schwartz, Campbell et al. 1986). Bien qu'elle soit essentielle dans ces conditions, la prolifération des

CMLVs peut favoriser la genèse et le développement de plusieurs maladies cardiovasculaires, à savoir l'athérosclérose, la resténose post-angioplastie et l'hypertension artérielle (Schwartz, Campbell et al. 1986, Marx, Totary-Jain et al. 2011).

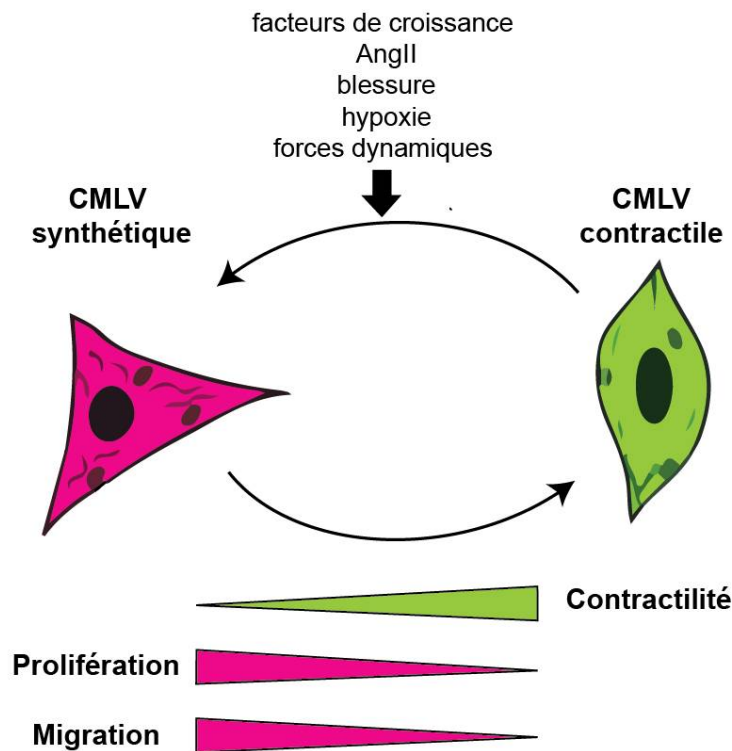


Figure 1. Régulation du phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires(CMLVs)

Plusieurs facteurs régulent le balancement entre le phénotype contractile et le phénotype synthétique. En conditions normales, les CMLVs ont un phénotype contractile se caractérisant par une forte expression de gènes contractiles et de faibles taux de prolifération et de migration. En conditions pathologiques et quelques conditions physiologiques, en réponse aux différents stimuli, les CMLVs deviennent synthétiques, elles se caractérisent par un taux élevé de prolifération et de migration (Davis-Dusenbery, Wu et al. 2011).

L'athérosclérose est une des maladies cardiovasculaires les plus importantes et elle est la première cause de mort dans le monde (<http://www.who.int/fr>). L'athérosclérose est caractérisée par un épaissement asymétrique de l'intima de l'artère et la formation d'une plaque (athérome) constituée de cellules, d'éléments du tissu conjonctif, de lipides et de débris cellulaires. Ceci résulte en la réduction ou le blocage du flux sanguin au niveau de l'artère altérée, provoquant un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (AVC) (<http://www.heart.org>). L'athérosclérose se développe suite à un dysfonctionnement ou une lésion de l'endothélium. L'hypertension, le diabète, la dyslipidémie et le tabagisme représentent des facteurs de risque. Après cette lésion initiale, différents types de cellules, y compris les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules inflammatoires, libèrent des cytokines et des facteurs de croissance qui induisent la transformation des CMLVs de phénotype quiescent contractile en CMLVs de phénotype synthétique prolifératif. Celles-ci migrent de la media vers l'intima, prolifèrent, synthétisent et secrètent de grandes quantités de composantes de la matrice extracellulaire telles que le collagène. Ce processus favorise la croissance de la plaque athéromateuse. Les cellules immunitaires et inflammatoires constituent la grande partie de l'athérome. Le centre est constitué de cellules spumeuses et de gouttelettes lipidiques extracellulaires, entouré d'un bouchon fibreux de CMLVs et de matrice riche en collagène. Les cellules T, les macrophages et les mastocytes infiltrent la lésion et sont particulièrement abondantes dans la région de l'athérome qui se développe (Lusis 2000) (**Fig 2**). La prolifération des CMLVs joue donc un rôle essentiel dans la formation de la néo-intima et la genèse de la plaque d'athérome (Sary 1990, Kolodgie, Burke et al. 2007). Cependant, à des stades avancés de la lésion, la prolifération des CMLVs peut être bénéfique, puisqu'elle permet de stabiliser le bouchon fibreux de la plaque et par conséquent prévient sa rupture (Falk, Nakano et al. 2013).

Les approches thérapeutiques actuelles pour rétablir le flux sanguin dans les artères obstruées par les plaques d'athérome impliquent l'intervention chirurgicale percutanée ou l'angioplastie pour placer une endoprothèse. Ces techniques perturbent l'intégrité normale des vaisseaux sanguins. Le risque de développer une réponse vasculaire causant un rétrécissement de la lumière du vaisseau, appelé resténose, est de 12.2 à 30% dépendamment de la génération des endoprothèses utilisées (Waksman and Steinvil 2016). La lésion de la paroi vasculaire

provoquée par ces techniques induit la libération de cytokines (PDGF, interleukin-1, interleukin-6 et TNF α) et de facteurs de croissance, qui favorisent la prolifération des CMLVs et la formation de néo-intima (Marx, Totary-Jain et al. 2011). En condition physiologique, l'endothélium agit comme une barrière sélective qui empêche les facteurs de croissance circulants dans le sang d'atteindre les CMLVs (Costa and Simon 2005). Les cellules endothéliales secrètent le monoxyde d'azote (NO) et la protéoglycane à héparane sulfate qui inhibent la prolifération des CMLVs et jouent un rôle protecteur. La dénudation de l'endothélium causée par l'intervention chirurgicale percutanée ou l'angioplastie promeut la prolifération des CMLVs, la formation de néo-intima et la progression rapide de la resténose.

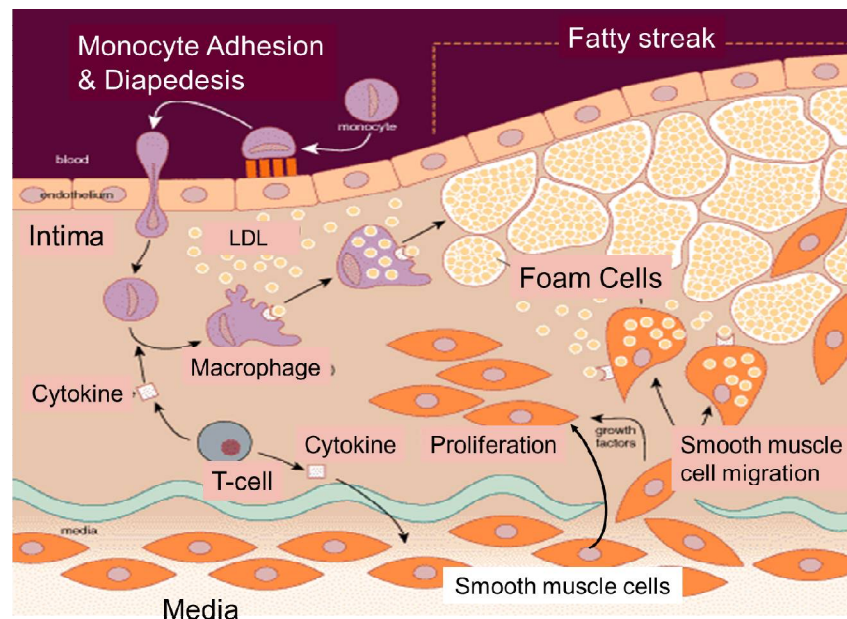


Figure 2. La pathogenèse de l'athérosclérose

Une lésion de l'endothélium favorise l'adhésion des monocytes, le relâchement des jonctions endothéliales et la migration des monocytes à travers l'endothélium vers la media où ils se différencient en macrophages. L'endothélium altéré permet également aux LDLs de pénétrer dans l'intima de l'artère et les macrophages commencent à englober les LDLs par phagocytose. Les macrophages chargés de lipides sont appelés «cellules spumeuses» et leur accumulation crée les stries grasses. Les cytokines sécrétées par les cellules immunitaires induisent la migration des CMLVs vers l'intima. Ces dernières commencent également à proliférer en réponse aux facteurs de croissance. L'accumulation progressive des cellules spumeuses et des CMLVs dans l'intima cause la croissance de la lésion et le rétrécissement de la lumière de l'artère (Wayne W. Lamorte, MD, PhD, MPH, Boston University School of Public Health).

Actuellement, le traitement de l'athérosclérose se limite alors à l'intervention chirurgicale percutanée ou l'angioplastie pour placer une endoprothèse avec un risque élevé (12-30 %) de développer une resténose. Il est donc nécessaire de développer des nouvelles stratégies qui n'affectent pas l'intégrité des vaisseaux afin de limiter l'incidence de resténose. L'utilisation des médicaments tels que les statines pour réduire le taux du cholestérol et des LDLs dans le sang apparaissait comme une idée idéale pour traiter l'athérosclérose mais il s'est avéré plus tard qu'elle n'était pas si parfaite que ça. En effet, malgré un effet bénéfique des statines sur la survie des patients atteints d'athérosclérose (1994), l'effet sur la régression des plaques d'athérome était presque négligeable (1%) (Nissen, Nicholls et al. 2006). De plus, des études récentes ont montré que les statines plutôt stimulent la progression de l'athérosclérose et causent l'insuffisance cardiaque (Okuyama, Langsjoen et al. 2015), d'où l'urgence de trouver des nouvelles cibles pour traiter l'athérosclérose. La prolifération des CMLVs se présente donc comme une cible potentielle. Dans ce contexte, une étude récente effectuée chez un petit nombre de patients s'avère encourageante. Cette dernière montrait que l'utilisation de la drogue antiproliférative paclitaxel réduit significativement le volume des plaques d'athérome (Shiozaki, Senra et al. 2016).

L'inhibition de la prolifération des CMLVs a déjà montré son efficacité dans la prévention de la resténose. Deux familles de médicaments sont utilisées dans des endoprothèses à élution. Les deux inhibent la prolifération des CMLVs: la rapamycine et ses analogues (zotarolimus et everolimus) (Marx, Jayaraman et al. 1995, Morice, Serruys et al. 2002, Ruygrok, Desaga et al. 2007, Leon, Kandzari et al. 2009) et le paclitaxel (Axel, Kunert et al. 1997, Stone, Ellis et al. 2004). Cependant, de nombreux facteurs posent des limites à l'utilisation des endoprothèses à élution, à savoir leur prix inabordable dans plusieurs zones géographiques et le risque élevé d'hémorragie en raison du traitement anti-plaquettaire prolongé qui les accompagnent (Alfonso, Byrne et al. 2014).

Finalement, les CMLVs jouent un rôle primordial dans la pathogenèse et l'évolution de l'hypertension artérielle. Bien que l'étiologie soit extrêmement complexe et variable entre les individus, la majorité des cas d'hypertension se caractérisent par une augmentation de la résistance périphérique des vaisseaux causée par l'augmentation de la contractilité des CMLVs et le remodelage vasculaire (Folkow 1982, Mulvany, Baumbach et al. 1996). Le phénotype

contractile des CMLVs favorise surtout les premières étapes de l'évolution de la maladie (Folkow 1982), mais les forces dynamiques exercées sur la paroi vasculaire pendant l'évolution chronique de l'hypertension artérielle vont induire un changement de phénotype des CMLVs qui deviennent synthétiques (Zhang, Xie et al. 2010). Elles prolifèrent, synthétisent et secrètent de grandes quantités de composantes de la matrice extracellulaire (Lehoux and Tedgui 1998), ce qui provoque un remodelage vasculaire résultant en l'épaississement de la paroi vasculaire et une aggravation de la maladie.

2. Les modulateurs de la prolifération

La prolifération physiologique ou pathologique des cellules musculaires lisses vasculairesse produit principalement en réponse à des agonistes qui activent les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) ou à des facteurs de croissances qui stimulent les récepteurs tyrosine kinase (RTKs). Le processus de prolifération implique de multiples intermédiaires tels que les ROS, les petites protéines G, les MAP kinases et la voie mTOR.

2.1. La voie des récepteurs couplés aux protéines G

2.1.1. Les récepteurs couplés aux protéines (RCPGs)

La famille des RCPGs est la plus grande et la plus diverse des récepteurs membranaires chez les eucaryotes. Ils constituent la cible de 30 à 50% des médicaments commercialisés (Salon, Lodowski et al. 2011). Tous les RCPGs ont une structure caractérisée par la présence de sept segments alpha-hélicoïdaux membranaires séparés par des régions de boucles alternées intra et extra cellulaires. Les RCPGs des vertébrés sont habituellement divisés en cinq familles sur la base de leurs similarités de séquence et de structure (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003). Comme leur nom l'indique, les RCPGs interagissent avec les protéines G au niveau de la membrane plasmique. Ces dernières sont des protéines hétérotrimériques composées de trois sous-unités différentes: alpha, bêta et gamma (**Fig 3**). La sous-unité alpha (G_α) lie soit le

GTP (état actif) ou le GDP (état inactif). Il existe quatre classes principales de la sous-unité G_α : G_{as} , G_{ai} , $G_{\alpha q/11}$ et $G_{\alpha 12}$ (Simon, Strathmann et al. 1991, Downes and Gautam 1999). En l'absence du signal, le complexe protéine G (α , $\beta\gamma$) est associé au récepteur (Gales, Van Durm et al. 2006). La liaison d'un ligand provoque une modification conformationnelle du récepteur, qui augmente l'affinité du récepteur vers le complexe protéine G. Ce dernier est donc recruté et activé. G_α relâche ainsi la molécule GDP et lie un GTP (Katritch, Cherezov et al. 2013). Les sous-unités (α , $\beta\gamma$) se réorganisent ensuite pour s'ouvrir et offrir des nouvelles interfaces pour l'interaction et l'activation de leurs effecteurs (Bunemann, Frank et al. 2003). Les cibles spécifiques des protéines G activées comprennent de nombreuses enzymes (adénylate cyclase, phospholipase C, etc.) qui produisent des seconds messagers (AMP cyclique, DAG, IP3, etc.), des transporteurs membranaires, certains canaux ioniques qui permettent aux ions d'agir en tant que seconds messagers et d'autres protéines impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires (Wettschureck and Offermanns 2005). Certaines protéines G stimulent l'activité de ces cibles (ex : G_{as}) tandis que d'autres sont inhibitrices (ex: G_{ai}). L'hydrolyse du GTP catalysée par la protéine RGS (Regulator of G protein Signaling) met fin au signal et les sous-unités (α , β et γ) reprennent leur conformation de repos. Les récepteurs activés sont phosphorylés par les kinases GRKs (G-protein coupled Receptor Kinases). Les récepteurs phosphorylés recrutent les β -arrestines, qui bloquent le couplage des protéines G au récepteur, potentiellement par un mécanisme d'empêchement stérique, conduisant au phénomène de désensibilisation. Les β -arrestines induisent également l'endocytose dépendante de la clathrine des RCPGs activés ainsi que l'activation de voies de signalisation indépendantes des protéines G (Ghosh, Kumari et al. 2015) (**Fig 3**). La dernière décennie a connu l'émergence du concept de signalisation biaisée des RCPGs qui promet un progrès dans la découverte des médicaments. Ce concept implique que plusieurs agonistes d'un RCPG n'induisent pas le même changement conformationnel du récepteur. Un agoniste donné stabilise plutôt une conformation du récepteur unique à lui pour créer un signal «biaisé» vers des voies de signalisation spécifiques (Kenakin and Christopoulos 2013). Ceci pourrait être très utile pour développer des médicaments avec plus d'efficacité et moins d'effets indésirables.

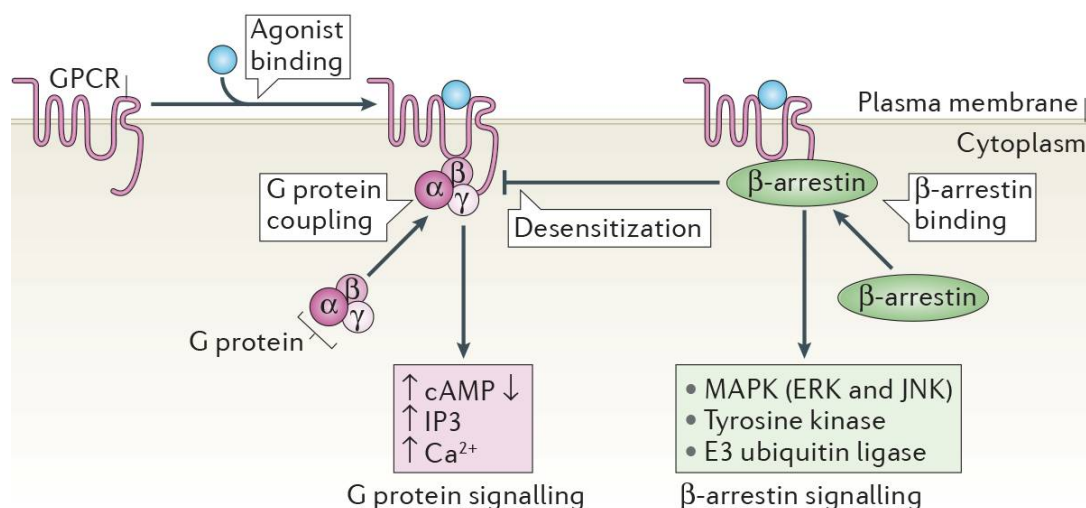


Figure 3. Les RCPGs, les protéines G et les β-arrestines

La liaison du ligand induit une modification conformationnelle du récepteur RCPG entraînant son activation. Les récepteurs activés se couplent à des protéines G hétérotrimériques composées de sous-unités G_α , G_β et G_γ . Ensuite, les protéines G se dissocient et la signalisation de la protéine G sert de médiateur à la génération de seconds messagers tels que l'AMP cyclique, l'inositol triphosphate (IP3) et le Ca^{2+} . Les récepteurs activés sont phosphorylés, principalement dans l'extrémité carboxyle, par les kinases GRKs. Les récepteurs phosphorylés recrutent les β-arrestines, qui sont des protéines adaptatrices multifonctionnelles. Ces dernières bloquent encore le couplage RCPG-protéines G. Les β-arrestines induisent l'endocytose dépendante de la clathrine des RCPGs activés ainsi que d'autres voies de signalisation indépendamment des protéines G telles que la voie des MAPKs (ERK et JNK), les tyrosine kinases (ex: Src) et les ubiquitine ligases E3 (ex: AIP4) (Ghosh, Kumari et al. 2015).

Au niveau vasculaire, plusieurs hormones vasoactives se lient spécifiquement à leurs récepteurs RCPGs à la surface des CMLVs pour activer des cascades de signalisation intracellulaires et promouvoir la prolifération cellulaire. Parmi elles, on note : l'endotheline-1 (Hirata, Takagi et al. 1989, Alberts, Peifley et al. 1994), la thrombine (McNamara, Sarembock et al. 1993), les catécholamines (norépinephrine) (Blaes and Boissel 1983) et l'angiotensine II qui est l'un des agonistes les plus étudiés et dont le rôle est le plus critique dans le contexte cardiovasculaire.

2.1.2. L'angiotensine II (AngII)

L'AngII est un octapeptide vasoactif qui joue un rôle principal dans le système "rénine-angiotensine-aldostérone" dont la fonction est de maintenir l'homéostasie cardiovasculaire. L'AngII est le produit final de deux clivages enzymatiques de l'angiotensinogène. Sa synthèse est induite en réponse à plusieurs conditions à savoir: la diminution de la concentration du sodium au niveau de la macula densa du rein, la diminution de la pression de la perfusion rénale et l'activation par le système sympathique. Ces conditions stimulent les cellules juxta glomérulaires qui sécrètent la rénine (Dzau 1993). Celle-ci va cliver l'angiotensinogène pour générer le décapeptide inactif, l'AngI, qui va ensuite être clivé en AngII par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'AngII agit directement sur les cellules musculaires lisses vasculaires en induisant une vasoconstriction mais interagit aussi avec le système sympathique central et périphérique pour contrôler le tonus vasculaire (Dzau 1993). L'AngII augmente la rétention de l'eau et du sodium au niveau rénal en induisant la sécrétion de l'aldostérone et de la vasopressine (Aguilera 1992, Thekkumkara, Cookson et al. 1998). Au niveau cellulaire, l'AngII promeut la migration, la prolifération et l'hypertrophie des CMLVs (Bell and Madri 1990, Daemen, Lombardi et al. 1991, Huckle and Earp 1994). Cette hormone induit l'expression de plusieurs facteurs tels que: l'ET1 (Hahn, Resink et al. 1990), le PDGF-A et B (Abe, Deguchi et al. 1997), le bFGF (Itoh, Mukoyama et al. 1993), l'epiregulin (Taylor, Cheng et al. 1999), l'IL-6 (Han, Runge et al. 1999), l'IGF-I (Delafontaine and Lou 1993) et le HB-EGF (Kayanoki, Higashiyama et al. 1999). L'AngII agit via deux principaux types de récepteurs soit l'AT1 et l'AT2.

2.1.3. Les récepteurs de l'AngII

Les récepteurs de l'AngII sont des RCPGs. L'AT1 et l'AT2 déclenchent des signaux cellulaires différents mais la plupart des effets physiologiques de l'AngII sont conférés aux récepteurs AT1 couplés aux protéines $G_{\alpha q/11}$ et $G_{\alpha 12/13}$ (Ushio-Fukai, Griendling et al. 1998). Une fois liée à son récepteur AT1, l'AngII va induire un changement conformationnel du récepteur et l'activation des protéines G qui interagissent avec une multitude d'effecteurs en aval comme la phospholipase C (PLC), la phospholipase A2 (PLA2) et la phospholipase D (PLD) (Ushio-Fukai, Alexander et al. 1999, Hunyady and Catt 2006) (**Fig 4**). L'activation de

la PLC produit l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). Le DAG active la protéine kinase C (PKC) tandis que la fixation de l'IP3 sur ses récepteurs sarcoplasmiques augmente la concentration intracellulaire du Ca^{2+} qui se lie à la calmoduline et active la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLC) entraînant la contraction des CMLVs (Yan, Kim et al. 2003). L'AT1 active aussi les MAP Kinases ERK1/2, p38 et JNK qui sont impliquées dans la prolifération et l'hypertrophie cellulaire (Suzuki, Motley et al. 2005, Hunyady and Catt 2006). De multiples effets physiologiques et pathologiques sont liés à l'activation des NADPH oxydases et la production des radicaux libres d'oxygène (ROS) (Griendling, Sorescu et al. 2000). Ceci nécessite l'activation de la GTPase Rac1 (Zuo, Ushio-Fukai et al. 2005). Dans le but de réguler le signal cellulaire après la stimulation par l'AngII, les récepteurs AT1 sont rapidement phosphorylés par les kinases GRKs puis internalisés dans un phénomène de désensibilisation qui implique les β -arrestines (Gáborik, Szaszák et al. 2001) et la GTPase ARF6 (Poupart, Fessart et al. 2007). Contrairement aux récepteurs AT1, la liaison de l'AngII aux récepteurs AT2 induit des effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs (Pollman, Yamada et al. 1996, Yamada, Horiuchi et al. 1996). Ces récepteurs sont fortement exprimés au niveau des tissus fœtaux et leur niveau d'expression chute après la naissance ce qui suggère qu'ils jouent un rôle important dans le développement (Shanmugam, Llorens-Cortes et al. 1995, Shanmugam, Corvol et al. 1996).

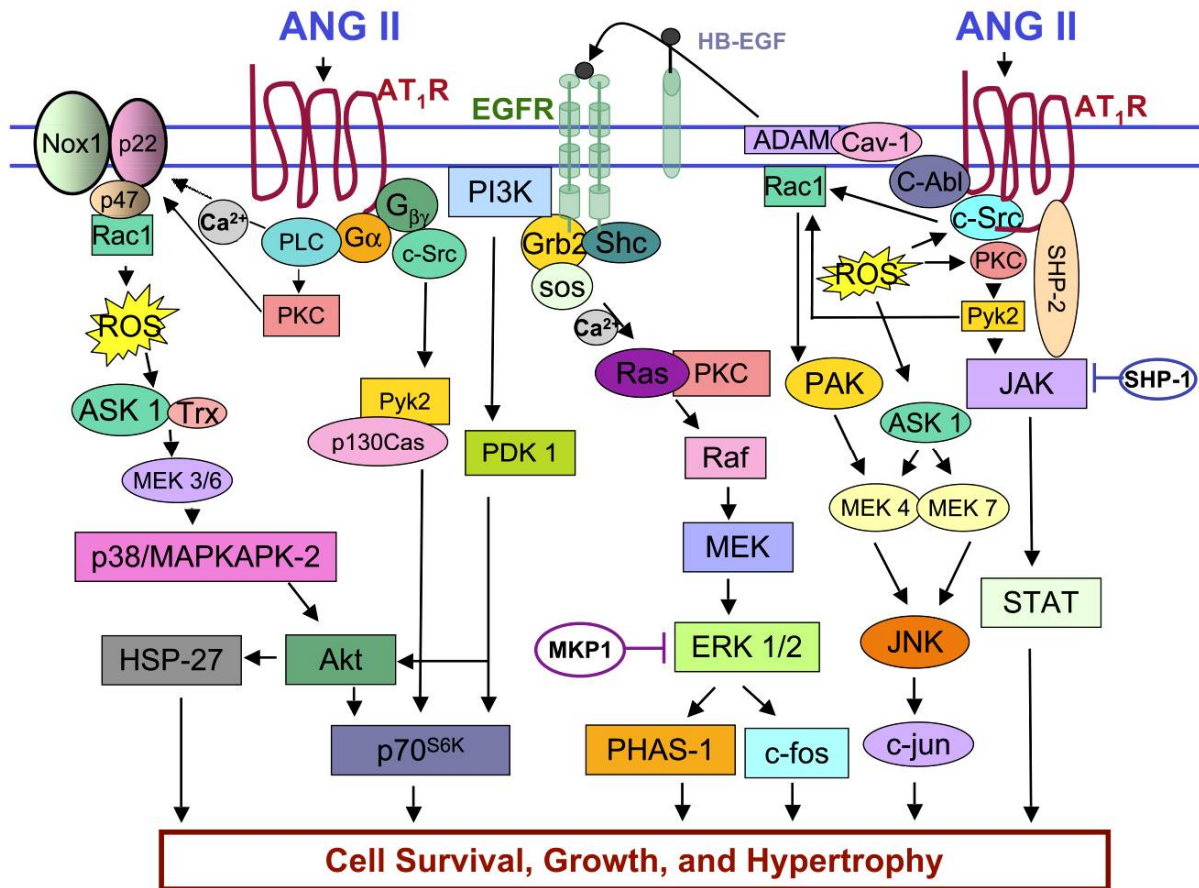


Figure 4. La signalisation de l'AngII dans la prolifération et la survie des CMLVs

L'AngII régule la survie, la prolifération et l'hypertrophie des CMLVs. Via l'activation de PKC, l'AngII active la NADPH oxydase, une source principale des ROS cellulaires. De plus, l'AngII induit la transactivation de l'EGFR de manière dépendante des ROS et de c-Src. L'AngII favorise également la survie cellulaire via les voies p38MAPK/MAPKAPK-2/Akt et PI3K/PDK1/Akt. La promotion de la prolifération cellulaire et de l'hypertrophie par l'AngII implique les MAP kinases p38MAPK, ERK et JNK ainsi que la voie JAK/STAT, qui conduisent tous à des changements dans la transcription des protéines cellulaires. Abréviations: ADAM, A disintegrin and metalloproteinase; JAK, Janus kinase, EGFR, epidermal growth factor receptor; HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor; ASK, apoptosis signal-regulating kinase; Trx, thioredoxin; ROS, reactive oxygen species; HSP, heat-shock protein; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; Cav-1, caveolin-1; PKC, protein kinase C; MKP-1, MAP kinase phosphatase-1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PDK-1, 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (Mehta and Griendling 2007).

2.1.4. L'AngII dans les pathologies cardiovasculaires

L'AngII promeut divers effets tels que la production des ROS, l'inflammation, la migration et la prolifération cellulaire, l'altération du tonus vasculaire et la fibrose. Tous ces facteurs combinés favorisent le développement des maladies cardiovasculaires, y compris l'hypertension, l'athérosclérose, la resténose après angioplastie et les maladies du cœur. Le rôle de l'AngII dans l'hypertension est bien caractérisé. Les antagonistes des récepteurs AT1 (candesartan, losartan, etc.) et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'AngII (ramipril, enalapril, etc.) sont efficacement utilisés dans le traitement de l'hypertension depuis longtemps. Étant donné la complexité des voies de signalisation de l'AngII, il est difficile d'attribuer l'effet bénéfique des antagonistes AT1 et des inhibiteurs de l'ECA à une voie spécifique mais il s'agit plutôt d'un effet synergique. Ces médicaments contrôlent l'hypertension en régulant le tonus vasculaire à court terme et en inhibant la prolifération des CMLVs et le remodelage vasculaire à long terme. L'implication de l'AngII dans l'athérosclérose et la resténose a été bien démontrée en clinique et *in vivo*. Le ramipril réduit significativement l'incidence d'infarctus de myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux chez des patients à haut risque (Yusuf, Sleight et al. 2000). En accord avec cela, les études *in vivo* montrent que l'expression des récepteurs AT1 est augmentée dans la néo-intima de l'aorte du rat après une angioplastie (Viswanathan, Stromberg et al. 1992). L'AngII peut également jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose induite par l'hypercholestérolémie. En effet, l'hypercholestérolémie augmente les niveaux d'angiotensinogène et d'AngII chez la souris (Daugherty, Rateri et al. 2004). De plus, dans les souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE), le blocage des récepteurs AT1 par le losartan empêche la peroxydation lipidique et diminue ainsi la formation des lésions d'athérosclérose (Keidar, Attias et al. 1997). Les souris double knockout apoE/AT1 ont également une athérosclérose réduite (Wassmann, Czech et al. 2004). Le mécanisme par lequel l'AngII favorise le développement de l'athérosclérose aortique et la formation d'anévrisme pourrait être indépendant de l'hypertension artérielle (Daugherty, Manning et al. 2000). L'AngII favorise aussi la resténose ; les antagonistes des récepteurs AT1 (candesartan) ont montré un effet bénéfique dans la prévention de la resténose après angioplastie mais pas les inhibiteurs de l'ECA (Schindler, Mueller et al. 2007).

2.2. La voie des récepteurs tyrosine kinase

2.2.1. Les récepteurs tyrosine kinase (RTKs)

Les récepteurs tyrosine kinase (RTKs) sont des récepteurs transmembranaires qui lient principalement les facteurs de croissance. Ils jouent un rôle clé dans la prolifération cellulaire, la différenciation, le métabolisme et la motilité. Il existe 58 types de récepteurs RTK dans le génome humain (Robinson, Wu et al. 2000). La liaison du ligand induit une dimérisation ou une oligomérisation des RTKs. La juxtaposition des domaines cytoplasmiques des dimères ou oligomères favorise l'autophosphorylation en trans des résidus de tyrosine situés dans la boucle d'activation du domaine kinase ou dans la région juxta membranaire (Schlessinger 2000) induisant des changements conformationnels qui permettent de stabiliser l'état actif de la kinase (Hubbard 2004). Les résidus de tyrosine phosphorylés servent de sites de recrutement pour une multitude de protéines de signalisation en aval (des enzymes ou des protéines adaptatrices) se liant typiquement par l'intermédiaire de leurs domaines SH2 (Src homologie-2) ou PTB (phosphotyrosine-binding) qui reconnaissent les résidus tyrosines phosphorylés (Pawson, Gish et al. 2001).

Les RTKs peuvent être impliqués dans l'apparition et la progression de plusieurs cancers, soit par des mutations de gain de fonction ou par une surexpression du récepteur. Ces récepteurs sont aussi d'une grande importance dans la physiologie et la pathologie cardiovasculaire. Parmi les facteurs de croissance qui se lient à des RTKs au niveau des CMLVs, on note : le FGF (fibroblast growth factor) (Olson, Chao et al. 1992), le Gas6 (growth arrest-specific gene 6) (Melaragno, Wuthrich et al. 1998), le HGF (Hepatocyte growth factor) (Rosen, Grant et al. 1992), le PDGF (platelet derived growth factor) (Ferns, Raines et al. 1991), l'IGF-1 (insuline-like growth factor 1) (Standley, Obards et al. 1999) et l'EGF (epidermal growth factor) (Makki, Thiel et al. 2013, Schreier, Gekle et al. 2014).

2.2.2. L'EGF et le récepteur EGFR

Le facteur de croissance épidermique (EGF), découvert il y'a plus d'un demi siècle par le lauréat du prix Nobel, Dr Stanley Cohen et ses collègues, est un facteur de croissance qui promeut la survie et la prolifération cellulaire. Son récepteur, l'EGFR, est un récepteur tyrosine kinase appartenant à la famille ErbB, identifié dans l'étiologie du cancer au début des années 1980. Cette famille comprend l'EGFR (appelé aussi ErbB1 ou HER1) (Yarden and Sliwkowski 2001), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4). Il existe 11 ligands connus de la famille ErbB. (Forrester, Kawai et al. 2016). ErbB2 agit comme un corécepteur sans ligand. La relation entre ces ligands et les récepteurs ErbBs est illustrée dans la **Fig 5**. Outre l'EGF, les autres ligands de l'EGFR sont: le TGF- α (transforming growth factor alpha), le HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), l'ARG (amphiregulin), l'EGN (epigen), le BTC (betacellulin) et l'EPR (epiregulin) (Forrester, Kawai et al. 2016).

La liaison du ligand à l'EGFR entraîne une homodimérisation entre deux récepteurs EGFR ou une hétérodimérisation entre l'EGFR et un autre récepteur ErbB permettant l'activation intracellulaire du domaine tyrosine kinase et l'autophosphorylation de multiples résidus tyrosine (Yarden and Sliwkowski 2001, Arteaga and Engelman 2014). Ces tyrosines phosphorylées dans le domaine intracellulaire d'EGFR/ErbB recrutent les protéines adaptatrices qui activent les cascades de signalisation en aval. Les voies de signalisation les mieux caractérisées impliquent le recrutement de Shc/Grb2 pour activer la voie Ras/ERK ainsi que le recrutement de PI3K (phosphoinositide3-kinase) pour activer la voie Akt/mTOR (Yarden and Sliwkowski 2001, Wieduwilt and Moasser 2008).

L'EGFR est l'une des molécules les plus étudiées dans la biologie du cancer. L'antagonisme de l'EGFR par des anticorps ou l'inhibition de son activité tyrosine kinase par des petites molécules a montré des effets bénéfiques dans le cancer du poumon, le cancer colorectal et le cancer du pancréas (Wieduwilt and Moasser 2008, Arteaga and Engelman 2014). Parallèlement, les dernières années ont connu une augmentation des études de l'EGFR dans la physiopathologie cardiovasculaire (Makki, Thiel et al. 2013, Schreier, Gekle et al. 2014).

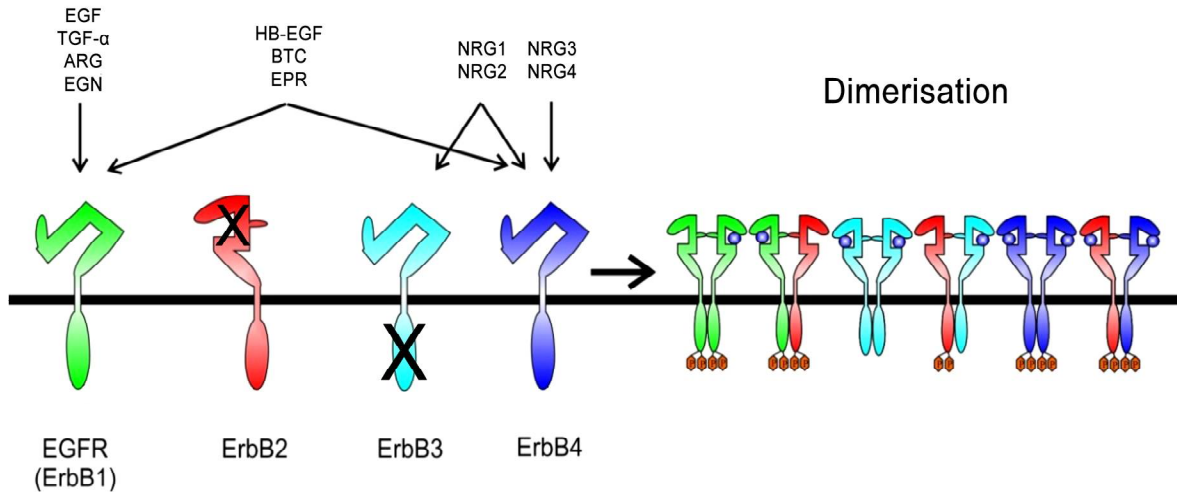


Figure 5. La famille ErbB des récepteurs RTKs

Quatre membres de la famille ErbB partagent une grande homologie dans le domaine extracellulaire et le domaine kinase. Cependant, ErbB3 ne possède pas d'activité tyrosine kinase. Jusqu'à présent, aucun ligand n'a été trouvé pour ErbB2, qui s'est révélé être le partenaire de dimérisation préféré pour les autres récepteurs. La liaison des ligands provoque l'homo/hétéro dimérisation des membres de la famille ErbB, augmentant la complexité de la transduction du signal. Abréviations: EGF, epidermal growth factor; TGF α , transforming growth factor alpha; ARG, amphiregulin; EGN, epigen; EPR, epiregulin; BTC, betacellulin; HB-EGF, heparin binding EGF; NRG, neuregulin (Hervent and De Keulenaer 2012).

2.2.3. La transactivation de l'EGFR par les RCPGs

L'activation de l'EGFR par des RCPGs activés est un mécanisme connu sous le nom de transactivation (Leserer, Gschwind et al. 2000, Wetzker and Bohmer 2003). La liaison des ligands aux RCPGs et l'activation des protéines G hétérotrimériques associées induit l'activation d'intermédiaires spécifiques qui favorisent la phosphorylation des résidus de tyrosine situés aux sites d'autophosphorylation de l'EGFR. Plusieurs intermédiaires ont été bien identifiés: la tyrosine kinase Src, le Ca^{2+} intracellulaire, les ROS et ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) (Ohtsu, Dempsey et al. 2006, George, Hannan et al. 2013, Overland and Insel 2015). ADAM17 est une métalloprotéase qui, une fois activée, catalyse la production et la libération de ligands matures de l'EGFR (Elliott, Bourne et al. 2013). Récemment, des nouveaux intermédiaires de la transactivation de l'EGFR ont été caractérisés: BMX (BMX nonreceptor tyrosine kinase), CHKA (choline kinase alpha) et TRIO (triple

functional domain) (George, Purdue et al. 2013) (**Fig 6**). La transactivation de l'EGFR nécessite habituellement l'activation des protéines G par les RCPGs. Cependant, dans certains cas, l'activation de l'EGFR dépend plutôt de la β -arrestine indépendamment des protéines G (Tilley 2011).

Parmi les nombreux RCPGs impliqués dans la transactivation de l'EGFR, l'accent a été mis sur la transactivation de l'EGFR induite par le récepteur AT1 de l'AngII en raison de l'importance de ce processus dans les pathologies cardiovasculaires (Higuchi, Ohtsu et al. 2007, Mehta and Griendling 2007). Beaucoup d'études *in vivo* et en clinique ont bien élucidé le lien entre l'AngII et l'EGFR dans l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et la resténose. La réduction de l'expression de l'EGFR en utilisant des oligonucléotides anti-sens réduit significativement la pression sanguine chez des rats infusés avec l'AngII ainsi que chez des rats spontanément hypertendus (Kagiyama, Eguchi et al. 2002, Kagiyama, Qian et al. 2003). L'inhibition de l'EGFR par AG1478, un inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, prévient également le développement de l'hypertension dans un modèle de résistance à l'insuline chez le rat (Nagareddy, MacLeod et al. 2010). Chez l'homme, l'augmentation du taux plasmatique de l'EGF est associée à une pression diastolique élevée et une grande rigidité de l'artère carotide (Lundstam, Hagg et al. 2007). Dans un modèle d'athérosclérose/resténose chez le rat, l'administration d'un anticorps bloquant l'EGFR (Chan, Kalmes et al. 2003) ou son inhibition (Pastore, Isner et al. 1995) inhibe l'épaississement de la media et la prolifération de la néo-intima. Dans le même modèle, l'hyperplasie de l'intima est réduite lorsque les artères carotides sont traitées avec un adénovirus codant un dominant négatif d'ADAM17 (Takaguri, Kimura et al. 2011). Finalement, chez l'homme, des niveaux d'expression élevés des ligands de l'EGFR (Dreux, Lamb et al. 2006) (Dreux, Lamb et al. 2006) ainsi que ceux d'ADAM17 (Oksala, Levula et al. 2009) ont été observés chez des patients atteints d'athérosclérose.

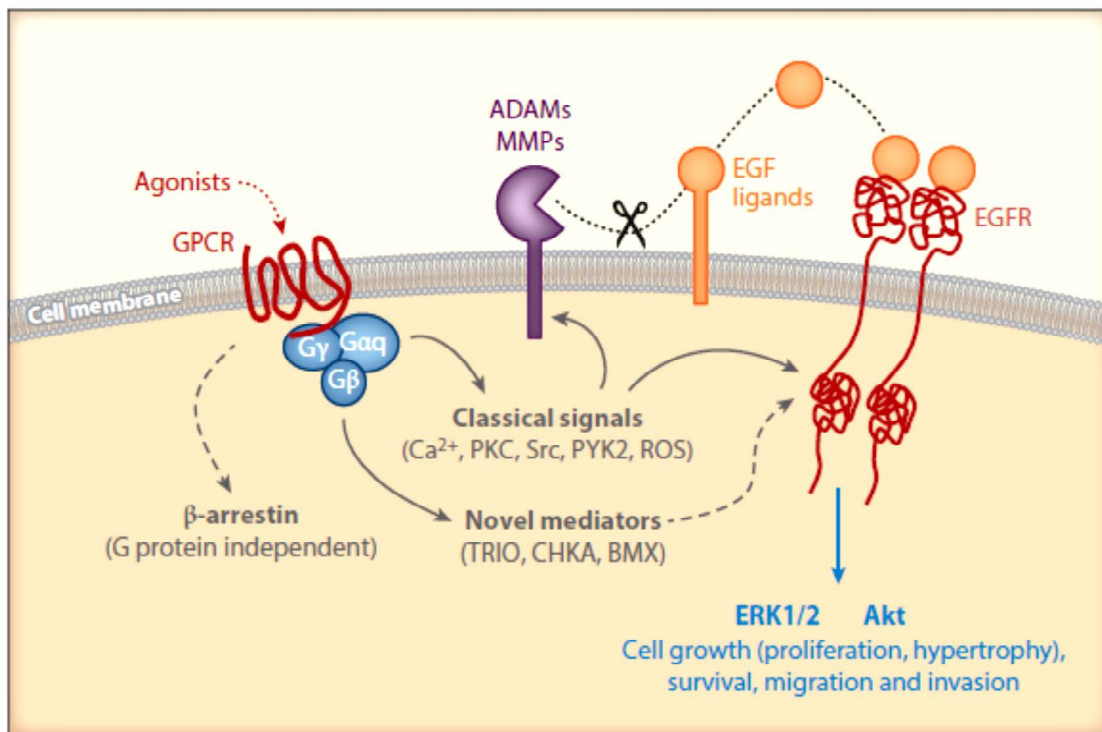


Figure 6. La transactivation de l'EGFR par les RCPGs

Les RCPGs activés par un ligand peuvent signaler via leurs protéines G hétérotrimériques apparentées (sous-unités α , β , γ) pour activer les second messagers classiques, qui peuvent à leur tour induire une cascade d'événements menant à la phosphorylation des tyrosines de l'EGFR indépendante de son ligand ou activer l'EGFR par les ligands libérés par ADAM/MMP. L'EGFR activé favorise la signalisation cellulaire liée à la prolifération et à la survie (activation d'ERK et d'AKT). Pour certains RCPGs, la transactivation de l'EGFR peut impliquer les β -arrestines indépendamment des protéines G. En outre, une approche de dépistage génomique fonctionnelle a identifié de nouveaux médiateurs pour la transactivation de l'EGFR par les RCPGs. Abréviations: ADAM, a disintegrin and metalloprotease; BMX, BMX nonreceptor tyrosine kinase; CHKA, choline kinase alpha; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GPCR, G protein-coupled receptor; MMP, matrix metalloproteinase; PKC, protein kinase C; PYK2, proline-rich tyrosine kinase 2; ROS, reactive oxygen species; TRIO, triple functional domain (PTPRF interacting) (Forrester, Kawai et al. 2016).

2.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

2.3.1. Les espèces et les sources des ROS

Les ROS sont des molécules très réactives dérivant de la réduction de l'oxygène. Ils comprennent: l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$). L'anion superoxyde est très réactif avec une très courte demi-vie. Il est incapable de traverser la membrane plasmique sauf éventuellement par des canaux ioniques (Touyz and Briones 2011). Trois types de superoxyde dismutase (SOD) catalysent la synthèse du H_2O_2 à partir du $O_2^{\cdot-}$: SOD1 ou Cu/Zn-SOD (cytoplasmique), SOD2 ou Mn-SOD (mitochondrial) et SOD3 ou EC-SOD (extracellulaire) (Mendez, Nicholson et al. 2005). Le H_2O_2 peut également être formé directement par les NADPH oxydases NOX4 et DUOX1/2 (Drummond, Selemidis et al. 2011). H_2O_2 est plus stable et traverse la membrane plasmique via des transporteurs membranaires de la famille des aquaporines (Bienert and Chaumont 2014).

Les ROS sont produits presque par toutes les cellules y compris les cellules de la paroi vasculaire (**Fig 7**). Les sources des ROS sont: les NADPH oxydases (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 et DUOX1/2), la mitochondrie, la xanthine oxydase (XO), la NOS (nitric oxyde synthase) découplée, la cyclo-oxygénase (COX), le cytochrome P450 et la lipoxigénase (Montezano and Touyz 2014). La mitochondrie et les NADPH oxydases constituent la principale source de ROS au niveau de la paroi vasculaire (Touyz and Briones 2011).

À faibles concentrations intracellulaires, les ROS jouent un rôle d'intermédiaires dans la signalisation cellulaire (Finkel 2011). Les cellules sont dotées d'un système antioxydant qui permet de maintenir les ROS à des niveaux physiologiques. Ce système comprend des enzymes (la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase, etc.) et d'autres antioxydants non enzymatiques (la vitamine C, la vitamine E, le β -carotène, la bilirubine, etc.). Cependant, un déséquilibre entre la production des ROS et les systèmes antioxydants qui les neutralisent résulte en l'accumulation de niveaux excessifs de ROS qui favorisent le développement de maladies cardiovasculaires (Hulsmans and Holvoet 2010, Touyz and Briones 2011).

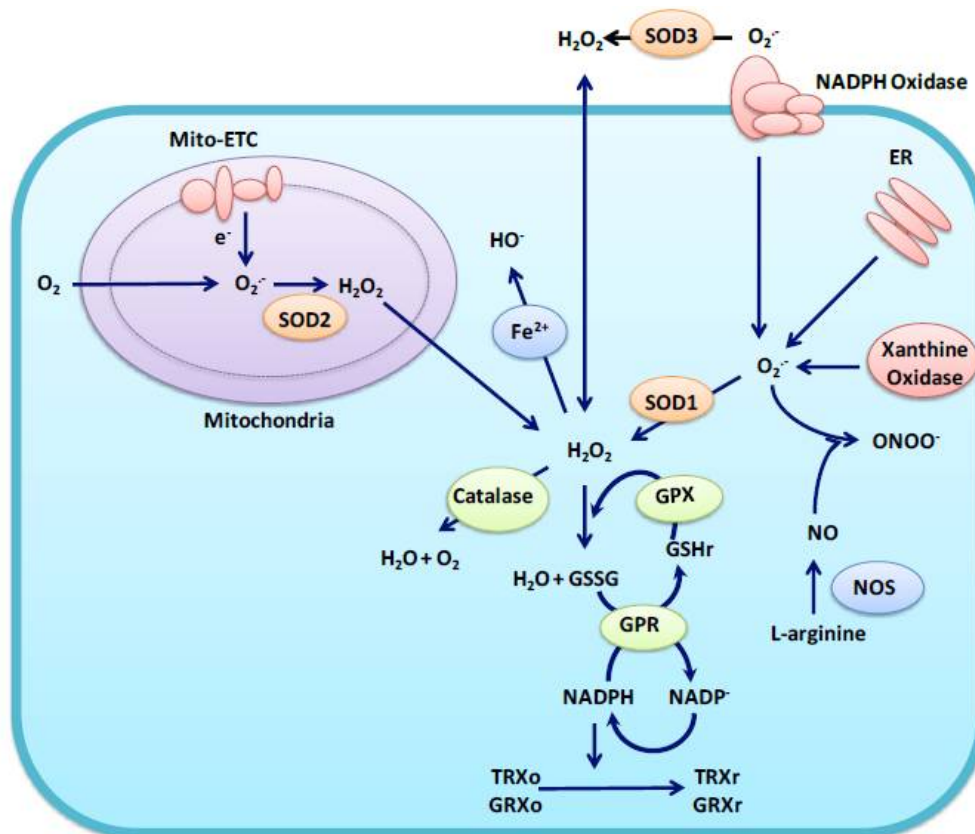


Figure 7. L'homéostasie des ROS

Les principales sources des ROS comprennent la chaîne de transport d'électrons au niveau de la mitochondrie (Mito-ETC), le réticulum endoplasmique (ER), la NADPH oxydase et la xanthine oxydase. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est l'espèce produite en premier. Il est ensuite converti en d'autres espèces réactives. Dans la mitochondrie, l' $O_2^{\cdot-}$ est généré par la capture d'électrons s'échappant du Mito-ETC par l'oxygène moléculaire (O_2). L' $O_2^{\cdot-}$ peut être rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD), qui est ensuite transformé en H_2O par la catalase, la glutathion peroxydase (GPX) ou la thiorédoxine (TRX). En présence de métaux de transition tels que le Fe^{2+} , le H_2O_2 peut être converti en radicaux hydroxyle (HO^{\cdot}). Le NO a une demi-vie très courte et peut réagir avec l'anion superoxyde pour former l' $ONOO^{\cdot}$. Abréviations: Glutathione reductase (GPR); glutaredoxin oxidized (GRXo); glutaredoxin reduced (GRXr); glutathione reduced (GSHr); glutathione oxidized (GSSG); thioredoxin oxidized (TRXo); thioredoxin reduced (TRXr) (Trachootham, Alexandre et al. 2009).

2.3.2. Les cibles des ROS et leurs implications pathologiques

Des niveaux élevés de ROS peuvent cibler et altérer les lipides, les protéines et l'ADN. La peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines entraînent la modification de leurs fonctions. En effet, la peroxydation lipidique endommage les membranes cellulaires et peut générer des espèces lipidiques ayant une activité vasoconstrictrice (Guéraud, Atalay et al. 2010, Negre-Salvayre, Auge et al. 2010). De même, les ROS, particulièrement le H_2O_2 , induit des modifications post-traductionnelles des protéines. Ils ciblent les acides aminés contenant une molécule de soufre tel que le groupement thiol de la cystéine entraînant la formation d'acides sulféniques (-SOH), sulfiniques (-SOH₂) ou sulfoniques (-SO₃H) selon le degré de l'oxydation. Les modifications de cystéines aboutissent aussi à la glutathionylation (la formation d'une liaison disulfure inter ou intramoléculaire), qui provoque des dommages structurels et fonctionnels de ces protéines (Briones and Touyz 2010, Finkel 2011, Stanley, Thompson et al. 2014) aboutissant à une modification des réponses biologiques telles que la migration et la prolifération cellulaire.

Les ROS induisent ou interfèrent avec un grand nombre de voies de signalisation dans la cellule. Ils provoquent l'augmentation du calcium intracellulaire (Gordeeva, Zvyagilskaya et al. 2003) favorisant ainsi la contraction et le remodelage vasculaire, deux caractéristiques observées dans plusieurs maladies cardiovasculaires (Briones and Touyz 2010). Les ROS induisent la transcription et la sécrétion de facteurs de croissance (Herbert, Bono et al. 1996, Delafontaine and Ku 1997) et de cytokines inflammatoires (Naik and Dixit 2011) ainsi que l'activation de différentes voies prolifératives et migratoires, particulièrement la voie des MAP Kinases (McCubrey, Lahair et al. 2006). Il est également bien établi que les ROS sont impliqués dans la transactivation des récepteurs tyrosine kinase, comme l'EGFR dans les CMLVs (Rao 1996). Les ROS peuvent réguler l'activité des tyrosine kinases cytoplasmiques (Src, JAK2, etc.) positivement (Simon, Rai et al. 1998, Giannoni, Buricchi et al. 2005) ou négativement via l'inactivation des protéines tyrosine phosphatases (PTPs) qui les activent (Tang, Hao et al. 2005). L'activation des tyrosines kinases (récepteurs et cytoplasmiques) résulte en l'activation des voies Ras/MAP Kinases et PI3K/AKT et la promotion de la survie et la prolifération cellulaires. Les GTPases Rho et l'actine sont également sensibles aux ROS. En

effet, ces dernières peuvent induire l'activation de la voie RhoA/ROCK et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Stanley, Thompson et al. 2014).

Les ROS sont donc capables de promouvoir la prolifération et la migration cellulaires via toutes ces différentes voies de signalisation, ce qui justifie leur implication dans la plupart des maladies cardiovasculaires. En athérosclérose, le rôle des ROS a été bien identifié. Ces intermédiaires sont impliqués dans l'initiation de la maladie en favorisant l'oxydation des LDLs (low density lipoproteins) et la déplétion du NO endothélial qui est un facteur protecteur des vaisseaux. Aussi, ils accélèrent le développement de la maladie en stimulant la migration et la prolifération des CMLVs causant un remodelage vasculaire et un épaississement des artères (Harrison, Griendling et al. 2003, Stocker and Keaney 2004). Les ROS jouent également un rôle important dans le développement de la resténose. Leurs niveaux augmentent très rapidement après la chirurgie chez des modèles animaux (Szöcs, Lassègue et al. 2002) ainsi que chez des patients (Kochiadakis, Arfanakis et al. 2010). De plus, l'utilisation des antioxydants a été montrée comme une stratégie efficace pour réduire la resténose chez des patients après une chirurgie coronarienne (Tardif, Grégoire et al. 2003). L'implication des ROS dans l'hypertension artérielle a été bien caractérisée chez plusieurs modèles animaux (Rajagopalan, Kurz et al. 1996, Zalba, Beaumont et al. 2000, Kagota, Tada et al. 2007) mais le lien direct entre les deux reste encore à prouver chez l'homme (Montezano and Touyz 2014).

Malgré les données considérables faisant le lien entre les ROS et les maladies cardiovasculaires, les tentatives d'utilisation des antioxydants (vitamine C, vitamine E, etc.) en clinique pour améliorer les manifestations des maladies cardiovasculaires ont échoué (Myung, Ju et al. 2013), probablement en raison du manque de leur spécificité ou du rôle physiologique important et complexe des ROS. La plupart des antioxydants utilisés dans ces essais cliniques sont facilement accessibles (comme la vitamine E) mais ne sont pas forcément les meilleurs (Steinhubl 2008). Il serait pertinent de revoir la conception de ces études cliniques et essayer de trouver les meilleurs antioxydants à utiliser en optimisant la forme et la dose du médicament ainsi que la durée de l'essai. Il est important de souligner que l'échec des antioxydants en clinique ne réfute pas le rôle central des ROS dans les pathologies cardiovasculaires (Sugamura and Keaney 2011).

2.4. Les petites GTPases de la superfamille Ras

Chez l'homme, la superfamille des petites protéines G de type Ras comprend 154 petites GTPases monomériques (20-25 kDa) qui régulent divers processus cellulaires. La superfamille de Ras est divisée en cinq familles sur la base de leurs structures et fonctions: Ras, Rho, Rab, ARF et Ran (Colicelli 2004). Ces familles exercent multiples fonctions dans la signalisation cellulaire (Colicelli 2004, Wennerberg, Rossman et al. 2005).

1/ La famille Ras est impliquée dans la transduction du signal, la régulation de l'expression des gènes, la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation.

2/ La famille Rho joue un rôle dans la transduction du signal, l'organisation de l'actine et du cytosquelette, la forme et la polarité des cellules, la migration et les interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

3/ La famille Rab contrôle le trafic vésiculaire pendant l'endocytose et les voies sécrétoires de la cellule.

4/ La famille ARF régule également le trafic vésiculaire, l'endocytose et les voies sécrétoires.

5/ La famille Ran contrôle le transport nucléo-cytoplasmique et l'organisation du fuseau mitotique.

Comme toutes les protéines G, le cycle d'activation/inactivation des petites GTPases de la superfamille Ras comprend l'état actif lié au GTP et l'état inactif lié au GDP. Les petites GTPases possèdent des activités intrinsèques d'échange de nucléotides de guanine et d'hydrolyse de GTP. Cependant, ces activités sont trop faibles. Pour permettre un cycle efficace et rapide entre les deux formes (active et inactive), les facteurs d'échange des nucléotides guanine (GEF) et les protéines activatrices de GTPase (GAP) catalysent et régulent ces activités intrinsèques. Les GEFs stimulent l'échange du GDP pour un GTP et permettent l'activation de la GTPase tandis que les GAPs stimulent l'hydrolyse du GTP mettant fin à l'activation des petites protéines G (Bos, Rehmann et al. 2007). Dans leur état lié au GTP, les petites GTPases interagissent avec leurs effecteurs pour activer les voies de signalisation en aval. Chaque famille de GTPase possède ses GEFs et GAPs spécifiques. Les

familles Rho et Rab possèdent une troisième classe de protéines régulatrices, les inhibiteurs de la dissociation des nucléotides guanine (GDI). Tous les membres de la superfamille Ras possèdent un domaine catalytique G (core G domain) de 20 kDa (correspondant aux résidus Ras 4-166) qui est impliqué dans la liaison et l'hydrolyse du GTP (Vetter and Wittinghofer 2001). Les régions SI (Switch I, résidus Ras 30-38) et SII (Switch II, résidus Ras 59-76) changent de conformation au cours du cycle GDP/GTP et contribuent à la spécificité de liaison entre les différents effecteurs et le domaine effecteur de la GTPase active (résidus Ras 32-40) (Vigil, Cherfils et al. 2010).

2.4.1. Les GTPases ARFs

Les protéines ARFs (ADP-ribosylation factor) appartiennent à la famille ARF qui inclut aussi la protéine Sar1 et la sous famille ARL (ARF-like). Il existe six protéines ARF chez les mammifères qui peuvent être divisées en trois classes basées sur l'homologie de leurs séquences: Classe I (ARF1, ARF2 et ARF3), Classe II (ARF4 et ARF5) et Classe III (ARF6). ARF1 et ARF6 sont les mieux caractérisées. Les ARFs se localisent aux différentes membranes à travers la cellule, y compris la membrane plasmique et les membranes des endosomes, des lysosomes et des vésicules sécrétoires. La famille ARF se distingue des autres membres de la superfamille Ras par la présence d'une hélice amphipathique à l'extrémité N-terminale qui favorise la liaison aux membranes. En plus, toutes les protéines ARFs subissent une modification co-translationnelle à leur extrémité N-terminale, il s'agit d'une myristoylation qui est nécessaire pour leur recrutement membranaire ainsi que pour leurs fonctions. Le groupe myristoyl et l'hélice amphipathique N-terminale sont insérés dans la membrane après liaison du GTP (**Fig 8**). Ainsi, en plus des changements conformationnels dans les régions de liaison d'effecteur lors de l'échange du GDP pour le GTP, les protéines ARF subissent un deuxième changement de conformation qui renforce leur liaison à la membrane (Chavrier and Menetrey 2010). Les autres familles de la superfamille Ras, incluant les familles Ras, Rho et Rab ont plutôt des longues séquences hypervariables (HV) à leurs extrémités C-terminales auquel leurs ancres lipidiques (farnésyl ou géranylgeranyl) sont rajoutées permettant leur liaison à la membrane (Gillingham and Munro 2007). Les effecteurs d'ARFs sont donc

contraints à une position proche de la surface de la membrane contrairement à ceux de Rab et Rho, qui peuvent être situés à une certaine distance de la membrane (Gillingham and Munro 2007).

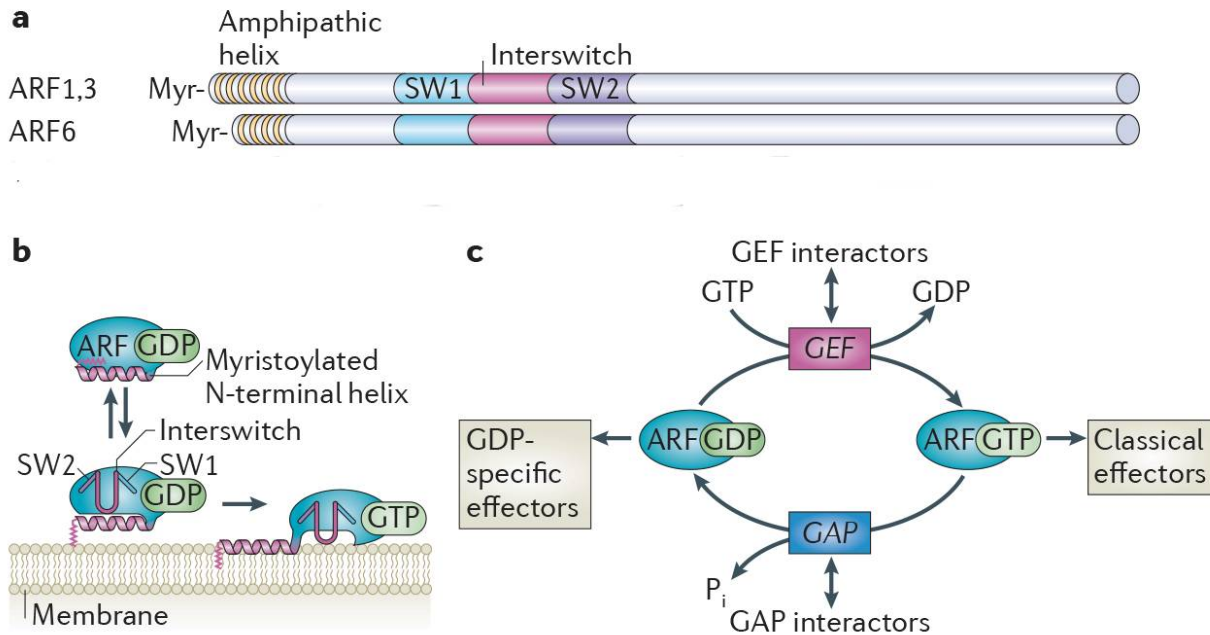


Figure 8. Les Protéines ARFs: structure et régulation

A/ Schéma représentatif des protéines ARFs, indiquant l'hélice amphipathique N-terminale conservée et la modification lipidique, myristoylation (Myr) à l'extrémité N-terminale, qui assurent ensemble une liaison serrée à la membrane. Les régions effectrices (G) lient les nucléotides de Guanine, les régions switch (SW1 et SW2) et la région d'interconnexion entre les régions switch (interswitch) sont représentées. Ces régions changent de conformation lors de l'échange GDP/GTP et sont impliquées dans les interactions avec les effecteurs. **B/** ARF-GDP s'associe de façon réversible à la surface de la membrane, et l'hélice N-terminale myristoylée assure une association serrée d'ARF-GTP à la membrane. Les régions SW1, SW2 et interswitch subissent un changement conformationnel suite à la liaison du GTP pour pénétrer dans la poche hydrophobe que l'hélice amphipathique N-terminale occupe sous la forme liée au GDP. **C/** Les protéines ARFs subissent un cycle de liaison et d'hydrolyse de GTP, médiées respectivement par les facteurs d'échange de nucléotides de guanine (GEFs) et les protéines activatrices de la GTPase (GAPs). La forme liée au GTP exerce ses fonctions par interaction avec des "effecteurs classiques" tels que les enzymes qui modifient la composition lipidique de la membrane. Cependant, d'autres effecteurs interagissent avec les GEFs et les GAPs eux-mêmes. Il existe aussi des effecteurs uniques qui s'associent spécifiquement à la forme ARF-GDP (Donaldson and Jackson 2011).

ARF1 et ARF3 sont libérées des membranes suite à l'hydrolyse du GTP. Cependant, ARF6 liée au GDP reste ancrée aux membranes. Pareillement, ARF4 et ARF5 liant le GDP ne se détachent pas des membranes du compartiment intermédiaire Réticulum endoplasmique-Golgi (Chun, Shapovalova et al. 2008, Duijsings, Lanke et al. 2009). Ceci suggère que les protéines ARFs ancrées aux membranes dans leur forme liant le GDP peuvent interagir avec des partenaires membranaires et servir de médiateurs de signalisation. Le modèle émergent implique que ces protéines ARFs constitutivement membranaires activent des effecteurs spécifiques et déclenchent des voies de signalisation distinctes dépendamment des nucléotides (GDP ou GTP) qu'elles lient (Martinu, Masuda-Robens et al. 2004, Haas, Yoshimura et al. 2007, Koo, Eipper et al. 2007, Falace, Filipello et al. 2010).

2.4.2. Les GEFs des ARFs

Il existe 15 GEFs connus des ARFs chez les mammifères classés en six sous-familles: GBF/Gea, BIG/Sec7, EFA6/PSD, BRAG/IQSEC, cytohésine/ARNO et FBXO8 (Gillingham and Munro 2007) (**Tableau I.A**). Ils partagent tous un domaine catalytique de 200 résidus d'acides aminés, le domaine Sec7. Tous les GEFs d'ARFs sont des protéines membranaires périphériques. En plus du domaine Sec7 commun, ils possèdent d'autres domaines différents qui sont généralement responsables du ciblage spécifique du GEF dans la cellule. Les GEFs GBF et BIG fonctionnent séquentiellement dans la voie sécrétoire en activant principalement ARF1 et ARF3. Les protéines GBF agissent au cis-Golgi tandis que les protéines BIG fonctionnent au niveau du réseau trans-Golgien (Zhao, Lasell et al. 2002, Puxeddu, Uhart et al. 2009). Les GEFs cytohésine, EFA6 et BRAG contrôlent principalement le trafic endosome-membrane plasmique. Ces deux derniers utilisent ARF6 comme substrat (Casanova 2007, Gillingham and Munro 2007). Le GEF FBXO8 contient un F-box en plus du domaine Sec7 et il est restreint aux vertébrés (Gillingham and Munro 2007). L'activation des ARFs par les GEFs GBF et BIG (ARF1, 3 et 5) est sensible à l'inhibiteur brefeldin A (BFA) qui fixe le complexe entre ARF-GDP et le domaine Sec7 du GEF et bloque ainsi l'échange du GDP pour un GTP (Peyroche, Antonny et al. 1999, Mossessova, Corpina et al. 2003, Renault, Guibert et al. 2003).

2.4.3. Les GAPs des ARFs

Les GAPs d'ARFs sont classées en 11 sous familles dont dix sont présentes chez l'homme: ARFGAP1, ARFGAP2/3, ADAP, SMAP, AGFG, GIT, ASAP, ACAP, AGAP et ARAP (Donaldson and Jackson 2011) (**Tableau I.B**). Toutes les GAPs d'ARFs contiennent un domaine catalytique de 140 résidus d'acide aminé, le domaine ARFGAP. En plus de ce dernier, elles possèdent différents domaines responsables de leur recrutement aux membranes, la régulation de leur activité GAP et d'autres fonctions d'échafaudage (Donaldson and Jackson 2011). Les GAPs d'ARFs des eucaryotes contiennent les domaines conservés: PH, BAR et C2 qui se lient aux lipides, ce qui suggère que l'interaction avec les lipides membranaires est une caractéristique fondamentale des GAPs d'ARFs (Schlacht, Mowbrey et al. 2013). La première GAP d'ARF clonée, ARFGAP1, est localisée au niveau du Golgi où elle catalyse avec ARFGAP2 et ARFGAP3 l'hydrolyse du GTP lié aux protéines ARFs Golgiens, particulièrement ARF1 (Cukierman, Huber et al. 1995).

Outre leur rôle dans la terminaison du signal des ARFs, les GAPs d'ARFs peuvent aussi jouer un rôle dans la transduction du signal dans la cellule. En effet, ASAP interagit avec de nombreuses molécules de signalisation, y compris Src et FAK (Inoue and Randazzo 2007), cette GAP se localise dans les adhérences focales et en réponse à son activation par Src, elle facilite la formation de podosomes et la dégradation de la matrice extracellulaire (Bharti, Inoue et al. 2007). De plus, GIT1 coordonne la signalisation en agissant comme une protéine d'échafaudage. Cette dernière régule avec ARF6 l'endocytose de plusieurs RCPGs par des voies dépendantes et indépendantes de la clathrine (Moore, Milano et al. 2007). GIT1 interagit aussi avec d'autres protéines telles que PIX (un GEF de Rac et Cdc42), FAK et la paxilline (Donaldson and Jackson 2011).

A/

Name	Substrate	Location	Motifs and domains	Interactors
ARF GEFs				
GBF1	ARF1,3,5	ERGIC, Golgi	DCB	p115 tether, Rab1, γ COP, Drs2 (with Gea2)
BIG1	ARF1,3	TGN, endosome, nucleus	DCB, AKAP	Myosin IXb, Exo70
BIG2	ARF1,3	TGN, endosome	DCB, AKAP	GABA receptor
Cytohesin 1	ARF1,6	PM, endosome	CC, PH, Polybasic	ARFRP1, CASP, ARL4, CNK1
Cytohesin 2	ARF1,3,6	PM, endosome	CC, PH, Polybasic	CASP, GRASP (tamalin), IPCEF, A2AR, β -arrestin, V-ATPase, ARL4, ARF6, CNK1, ERBB receptor
Cytohesin 3	ARF1,6	PM, endosome	CC, PH, Polybasic	CASP, GRASP (tamalin), THR, ARL4, ARF6, CNK1
Cytohesin 4	ARF1,5	–	CC, PH, Polybasic	–
EFA6A–D	ARF6	PM, endosome	PH, CC, pro	TWIK1 K ⁺ channel
BRAG1	ARF6	PSD	PH, CC, IQ	IRSp53
BRAG2	ARF6	PM, endosome, nucleus	PH, CC, IQ	AMPA receptor
BRAG3	ARF6	PSD	PH, CC, IQ	PSD95, Homer, utrophin (dystrophin), S-SCAM

B/

ARF GAPs*	Substrate	Location	Motifs and domains	Interactors
ARFGAP1	ARF1–5	Golgi	ALPS	–
ARFGAP2,3	ARF1–5	Golgi	Polybasic, Glo3 (ISS repeat)	COPI coat
ADAP1,2	–	–	Two PH	–
SMAP1,2	ARF1,6	–	Clathrin box, CALM	–
AGFG1,2	–	–	FG repeats	–
GIT1,2	ARF6	PM	ANK, SHD, CC, PBS	PIX, PLC γ , MEK1, FAK, GPCR kinase
ASAP1–3	ARF1,5,6 [†]	PM, FA	BAR, PH, ANK, Pro, SH3	CIN85 (SH3KBP1), cortactin, CRK, SRC, FAK, PYK2
ACAP1–3	ARF6	PM, endosome	BAR, PH, ANK	β 1 integrin, cellubrevin, transferrin R
AGAP1–11	–	–	GLD, PH, ANK	–
ARAP1–3	–	–	SAM, five PH, ANK, RhoGAP, RA	RhoA, CIN85, Rap1

Tableau I. Les GEFs (A) et les GAPs (B) des protéines ARF

Abréviations: A2AR, adenosine A2A receptor; ADAP, ARF GAP with dual PH domain-containing; AGFG, ARF GAP domain and FG repeats-containing; AKAP, A kinase-anchoring protein; ALPS, amphipathic lipid packing sensor; ANK, ankyrin repeat; ARF, ADP-ribosylation factor; ASAP, ARF GAP containing SH3, ankyrin repeat and PH domains; At, *Arabidopsis thaliana*; BAR, Bin–amphiphysin–Rvs; CALM, clathrin assembly lymphoid myeloid; CASP, cytohesin-associated scaffolding protein; CC, coiled-coil; Cin2, chromosome instability protein 2; CIN85, CBL-interacting protein 85; COPI, coatamer complex I; DCB, dimerization and cyclophilin-binding domain; Dm, *Drosophila melanogaster*; ERGIC, ER–Golgi intermediate compartment; FA, focal adhesion; FAK, focal adhesion kinase; FG, phenylalanine, glycine repeats; GABA, γ -aminobutyric acid; GAP, GTPase-activating protein; Gea, ARF guanine nucleotide exchange factor; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GEP, guanine nucleotide exchange protein; GLD, GTP-binding protein like domain; GNL1, guanine nucleotide-binding protein-like 1; GPCR, G protein-coupled receptor; GRASP, GRP1-associated scaffold protein; IPCEF, interaction protein for cytohesin exchange factors; IQ, IQ motif; MEK, MAPK/ERK kinase; PAG, Paxillin-associated protein with ARF GAP activity; PBS, paxillin binding site; PH, pleckstrin homology; PLC, phospholipase C; PM, plasma membrane; Pro, proline-rich; PSD, post-synaptic density; PYK, proline-rich tyrosine kinase; RA, Ras association motif; RP2, retinitis pigmentosa 2; SAM, sterile motif; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; SH3, SRC homology 3; SHD, SRC homology domain; S-SCAM, synaptic scaffolding molecule; TGN, trans-Golgi network; THR, thyroid hormone receptor; TWIK1, tandem of P domains in a weak inward-rectifying K⁺ channel 1; ZNF289, zinc-finger 289. ‡ ASAPs work better on ARF1 and ARF5 than on ARF6 (Donaldson and Jackson 2011).

2.4.4. ARF6

ARF6 est le membre le moins conservé des protéines ARFs. Il est localisé à la membrane plasmique et les membranes des compartiments endosomaux. La GTPase ARF6 située à la membrane plasmique régule à la fois l'organisation du cytosquelette d'actine en périphérie et le trafic membrane plasmique-endosome (Radhakrishna, Klausner et al. 1996, D'Souza-Schorey, van Donselaar et al. 1998, Boshans, Szanto et al. 2000). Au niveau de la membrane plasmique, ARF6 modifie la composition lipidique de la membrane par l'activation de deux enzymes, la PtdIns4P5K (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase) qui produit la PtdIns(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate) (Honda, Nogami et al. 1999) et la phospholipase D (PLD) qui génère l'acide phosphatidique (Shome, Nie et al. 1998) (**Fig 9**). Ces lipides sont importants pour le tri des protéines à l'intérieur de la membrane pour la formation de puits recouverts de clathrine pendant l'endocytose (Wenk and De Camilli 2004) et pour le recrutement et l'activation des petites GTPases de la famille Rho (comme Rac1) qui régulent la polymérisation de l'actine (Boshans, Szanto et al. 2000).

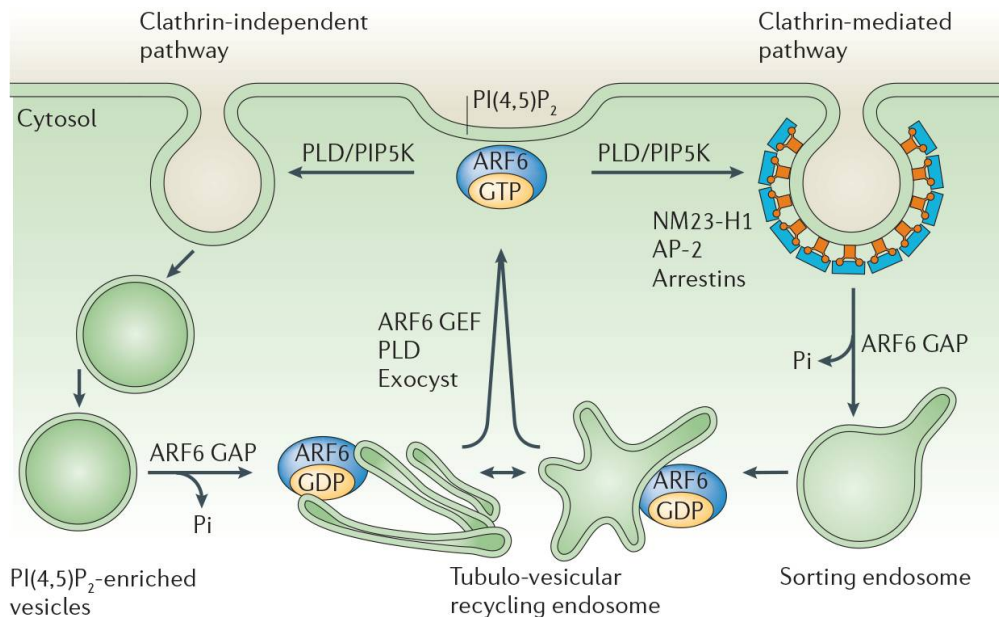


Figure 9. Rôle d'ARF6 dans l'endocytose et le recyclage des endosomes

Par son effet sur la PIP5K (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) et la PLD (phospholipase D), ARF6-GTP peut favoriser l'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine. Elle régule le recrutement de NM23-H1 et/ou de la protéine adaptatrice AP-2 facilitant ainsi l'endocytose dépendante de la clathrine. L'activation d'ARF6 a également été liée à la dissociation des β -arrestines des récepteurs pour faciliter leur internalisation. L'hydrolyse du GTP par ARF6, catalysée par des GAPs spécifiques, est nécessaire pour poursuivre le trafic tout au long de chaque voie d'endocytose, tandis que l'activation d'ARF6 par des GEFs spécifiques favorise le recyclage des endosomes et la fusion ultérieure des membranes endosomales avec la membrane plasmique. Le recyclage des membranes régulé par ARF6 est médié en partie par le complexe exocyst et la phospholipase D. Les vésicules de recyclage dérivés des voies d'endocytose dépendantes et indépendantes de la clathrine peuvent éventuellement converger dans un compartiment commun de recyclage (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006).

ARF6 est impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine des RCPGs (Poupart, Fessart et al. 2007) par son interaction avec AP2 (adaptor protein 2) et la clathrine (Paleotti, Macia et al. 2005). Dans certains cas, ARF6 peut être entraînée à l'intérieur des cellules avec les vésicules recouvertes de clathrine et peut activer la protéine JIP4 (JNK-interacting protein 4) pour faciliter le recyclage rapide du récepteur (ex: récepteur de la transferrine) à la membrane plasmique (Montagnac, de Forges et al. 2011). ARF6 est également impliquée dans l'endocytose indépendante de la clathrine dans certaines lignées cellulaires; elle s'associe aux membranes endosomales et favorise leur recyclage vers la membrane plasmique (Naslavsky,

Weigert et al. 2004). Le recyclage des endosomes permet de recycler les protéines membranaires importantes pour l'adhésion cellulaire et la migration vers la membrane plasmique (Balasubramanian, Scott et al. 2007, Grant and Donaldson 2009). En contrôlant le trafic membrane plasmique-endosome, ARF6 joue un rôle important dans la polarisation des cellules pendant la migration en favorisant le transport ciblé du Cdc42, Rac1 et du complexe PAR6 vers le front de migration de la cellule (Osmani, Peglion et al. 2010).

ARF6 et ses GEFs cytohésine et BRAG2 ont été impliqués dans l'assemblage et le désassemblage des jonctions d'adhérence (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006, Hiroi, Someya et al. 2006, Ikenouchi and Umeda 2010). Deux GAPs d'ARF6, ASAP1 et GIT1 se localisent aux adhérences focales et régulent l'adhésion à la matrice extracellulaire (Bharti, Inoue et al. 2007, Schmalzigaug, Garron et al. 2007). GIT1 interagit avec PIX, un GEF pour Cdc42 et Rac (Schmalzigaug, Garron et al. 2007), faisant le lien entre ARF6 et ces deux GTPases qui régulent la migration cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, ARF6-GDP peut aussi lier des effecteurs et transmettre des signaux cellulaires. Par exemple, ARF6-GDP recrute Kalirin, un GEF de la famille Rho, à la membrane facilitant l'activation de Rac1 et le contrôle de la dynamique de l'actine (Koo, Eipper et al. 2007). ARF6 joue donc un rôle primordial dans la migration cellulaire (Santy and Casanova 2001, Charles, Namkung et al. 2016) et l'invasion tumorale (Hashimoto, Onodera et al. 2004, Tague, Muralidharan et al. 2004) via son contrôle du trafic membrane plasmique-endosome et du remodelage de l'actine principalement à travers les GTPases Rho. ARF6 est également nécessaire aux dernières étapes de la cytokinèse. En effet, ARF6 se localise dans le corps médian (midbody) formé entre les cellules filles à la fin de la télophase où elle interagit avec la protéine MKLP1 (Mitotic Kinesin-Like Protein 1) afin de favoriser l'achèvement de la cytokinèse (Makyio, Ohgi et al. 2012). Ce rôle pourrait aussi être dû au contrôle du trafic membrane plasmique-endosome (Schweitzer, Burke et al. 2005). Pareillement, ARF6 joue un rôle important dans la cytokinèse des spermatocytes en favorisant le recyclage rapide des endosomes vers les membranes des cellules filles (Dyer, Rebollo et al. 2007). De plus, durant la cytokinèse, ARF6-GTP interagit avec les Arfophilines FIP3/4 permettant le recrutement des complexes Rab11/FIP3 et Rab11/FIP4 au corps médian et la régulation de l'abscission (Fielding, Schonteich et al. 2005).

2.4.5. Les GTPases Rho

La famille des GTPases Rho comprend 20 membres connus pour leurs rôles dans l'organisation du cytosquelette, la motilité cellulaire, la polarité cellulaire, le guidage des axones, le trafic de vésicules et le cycle cellulaire (Heasman and Ridley 2008, Vega and Ridley 2008). L'altération de la signalisation des GTPases Rho contribue au développement du cancer, des anomalies neurologiques et des maladies immunologiques (Hodge and Ridley 2016). Les protéines Rho subissent une modification post-traductionnelle (une isoprénnylation) à leur extrémité C-terminale résultant en l'ajout d'une chaîne lipidique (farnésyl ou géranylgéranyl), responsable de leur localisation au niveau des membranes cellulaires. En plus de l'isoprénnylation, plusieurs protéines Rho peuvent subir une S-palmitoylation (Berzat, Buss et al. 2005, Wang and Sebt 2005). La palmitoylation est un processus réversible qui permet aux GTPases d'interagir dynamiquement avec les membranes et de potentialiser la signalisation en aval (Linder and Deschenes 2007, Rocks, Gerauer et al. 2010). Les Rho GDI (GDP dissociation inhibitor), un groupe de 3 membres, régulent négativement l'activation des GTPases Rho en se liant à leurs groupes "isoprényl" (farnésyl ou géranylgéranyl) empêchant ainsi leur liaison à la membrane, ce qui les maintient dans le cytosol à l'état inactif (Dransart, Olofsson et al. 2005). Les GTPases Rho sont activées par deux familles distinctes de GEF. La première famille, DBL, inclut 70 membres qui partagent le domaine DH (DBL-homology domain) (Rossman, Der et al. 2005). La deuxième, DOCK, comprend 11 membres qui possèdent tous un domaine DHR (DOCK homolgy region) (Côté and Vuori 2007). Les GAPs des GTPases Rho partagent un domaine catalytique conservé, RhoGAP (~70 membres chez les mammifères) (Tcherkezian and Lamarche-Vane 2007).

2.4.6. Rac1

Les GTPases Rac de la famille Rho comportent 3 isoformes: Rac1 est ubiquitaire, Rac2 se trouve majoritairement dans les cellules hématopoïétiques tandis que Rac3 est exprimée dans le système nerveux central. Rac1 porte un géranylgéranyl qui permet sa liaison à la membrane cellulaire mais subit aussi une palmitoylation qui augmente sa stabilité et facilite son ciblage aux régions membranaires connectées à l'actine du cytosquelette (Navarro-Lerida,

Sanchez-Perales et al. 2012). Comme toutes les GTPases Rho, l'activité de Rac1 est régulée négativement par Rho GDI qui lie et piège son géranylgeranyl. La phosphorylation de Rac1 peut aussi réguler son activité, soit positivement ou négativement, dépendamment de la kinase impliquée et du site de phosphorylation. En effet, la phosphorylation de Rac1 sur la Tyr64 par Src ou FAK régule positivement son activité (Chang, Lemmon et al. 2011), tandis que sa phosphorylation sur la Ser71 par l'AKT semble augmenter sa forme liée au GDP (Kwon, Kwon et al. 2000).

En réponse aux différents stimuli extracellulaires, Rac1 est activée par les GEFs et elle interagit avec de nombreux effecteurs pour réguler le cytosquelette d'actine, la formation des lamellipodes et la migration mais aussi pour transmettre d'autres signaux cellulaires via différentes voies de signalisation. Rac1 se lie au complexe WAVE (contenant aussi Abi et IRSp53/58) et libère la protéine WAVE qui favorise la polymérisation de l'actine et la formation des lamellipodes via l'activation du complexe Arp2/3 (Eden, Rohatgi et al. 2002). De plus, Rac1 lie et active les kinases PAK1, PAK2 et PAK3, qui exercent plusieurs fonctions: **1/** elles activent la kinase LIM (LIMK) qui stimule la polymérisation de l'actine (Edwards, Sanders et al. 1999), **2/** elles phosphorylent et inactivent l'OP18/stathmin qui déstabilise les extrémités (+) des microtubules (Wittmann, Bokoch et al. 2004) et **3/** elles activent la voie Raf-1/MEK1/ERK1/2 promotrice de la prolifération (Arai, Jin et al. 2005). Rac1 régule également la phosphorylation de la myosine et la contraction des CMLVs (Shibata, Sakai et al. 2015). La GTPase Rac1 se lie à la sous-unité activatrice de la NADPH oxydase, p67 PHOX (ou NOXA1) pour induire la production des ROS (Hordijk 2006). Rac1 est aussi activée au niveau des adhésions cellule-cellule par l'E-cadhérine et elle est nécessaire pour l'accumulation des filaments d'actine, d'E-cadhérine et de β -caténine aux sites de contact cellule-cellule via son effecteur IQGAP (Malliri, van Es et al. 2004). De plus, elle promeut la survie cellulaire à travers la protéine anti-apoptotique BAD (Zhang, Zhang et al. 2004) et régule positivement la prolifération cellulaire via l'activation des voies JNK et p38MAPK (Minden, Lin et al. 1995) et l'induction de l'expression des cyclines D (Page, Li et al. 1999).

2.5. La voie des MAP Kinases (MAPKs)

Les MAPKs (mitogen-activated protein kinases) sont des Ser/Thr kinases qui convertissent les stimuli extracellulaires en une large gamme de réponses cellulaires. Toutes les cellules eucaryotes possèdent plusieurs voies MAPKs qui régulent plusieurs processus tels que l'expression des gènes, le métabolisme, la motilité, la survie, la prolifération, l'apoptose et la différenciation. Chez les mammifères, 14 MAPKs ont été caractérisées. Parmi elles, on trouve les MAPKs conventionnelles les plus étudiées comprenant: ERK1/2, p38MAPK (α , β , γ , et δ), JNK (1,2 et 3) et ERK5 (Pearson, Robinson et al. 2001). Chaque groupe de ces MAPKs est activé par des MAPK kinases (MAPKKs), elles même activées par et des MAPKK kinases (MAPKKKs) (**fig 10**). Les MAPKKKs sont des Ser/Thr kinases qui s'activent par phosphorylation et/ou par leur interaction avec une GTPase de la famille Ras/Rho en réponse à des stimuli extracellulaires. L'activation de MAPKKK conduit à la phosphorylation et à l'activation d'une MAPKK qui active la MAPK par une double phosphorylation sur les résidus Thr et Tyr dans un motif Thr-X-Tyr conservé situé dans la boucle d'activation de la MAP kinase (Cargnello and Roux 2011).

2.5.1. ERK1/2

ERK1 fut la première MAPK caractérisée (Boulton, Yancopoulos et al. 1990, Boulton, Nye et al. 1991). ERK1 et 2 sont ubiquitaires mais leurs niveaux sont particulièrement élevés dans le cerveau, le muscle squelettique, le thymus et le cœur (Boulton, Yancopoulos et al. 1990). Elles sont activées par les facteurs de croissance (PDGF, EGF, NGF, etc.), les agonistes des RCPGs (AngII, ET1, etc.) et les cytokines (Zhang and Liu 2002, Raman, Chen et al. 2007). La voie principale de l'activation d'ERK1/2 est celle des récepteurs tyrosine kinase. Suite à leur activation par des facteurs de croissance ou leur transactivation par des RCPGs, les RTKs se dimérisent et s'activent entraînant le recrutement des protéines adaptatrices (Shc, Grb2) au récepteur. L'interaction de SOS (un GEF de Ras) avec Grb2 active la GTPase Ras qui interagit avec ses effecteurs cibles particulièrement la MAPKKK Raf. Cette dernière phosphoryle et active MEK1/2 (MAPKK), qui active à son tour ERK1/2 (Zhang and Liu 2002). Dans les cellules quiescentes, ERK1/2 sont localisées dans le cytoplasme. Après un

stimulus extracellulaire, une grande proportion d'ERK1/2 s'accumule dans le noyau (Chen, Sarnecki et al. 1992, Lenormand, Sardet et al. 1993).

ERK1/2 activée peut phosphoryler un grand nombre de protéines en aval dans le cytoplasme (TSC2, RSK, MNK, etc.) et dans le noyau, y compris de nombreux facteurs de transcription (Elk-1, c-Fos, c-Myc, STAT3, etc.). D'autres substrats d'ERK1/2 sont cependant associés aux membranes (CD120a, Syk et calnexin) et au cytosquelette (neurofilaments et paxilline) (Yoon and Seger 2006).

La voie ERK1/2 joue un rôle central dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Son activation est nécessaire à la transition G1/S du cycle cellulaire (Meloche and Pouyssegur 2007). ERK1/2 phosphoryle et active le facteur de transcription Elk-1 qui induit l'expression des gènes précoces immédiats (immediate early genes) comme celui de c-Fos (Gille, Kortjenann et al. 1995). ERK1/2 stabilise ensuite la protéine c-Fos par phosphorylation directe (Murphy, Smith et al. 2002) permettant ainsi sa liaison avec c-Jun pour former le complexe de transcription AP-1 (Whitmarsh and Davis 1996). Ce dernier induit l'expression de la cycline D1 (Shaulian and Karin 2001) qui se lie à la CDK4/6 (cyclin dependent kinase 4/6) pour former le complexe actif CDK4/6-cycline D1. Ce complexe phosphoryle ensuite la protéine Rb (retinoblastoma protein) provoquant l'activation du facteur de transcription E2F qui régule la transcription des gènes nécessaires pour la transition G1/S (Meloche and Pouyssegur 2007). ERK1/2 active également un autre complexe nécessaire à la transition G1/S, le CDK2-cycline E. En phase G1, ce complexe est lié à la protéine inhibitrice P27. L'activation d'ERK1/2 induit l'expression du facteur de transcription c-myc qui permet la dissociation de la protéine P27 du complexe CDK2-cycline E, ce qui entraîne sa phosphorylation et sa dégradation (Kerkhoff and Rapp 1998). ERK1/2 peut aussi phosphoryler la P27 directement et entraîner sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome (Zhang and Liu 2002).

2.5.2. p38MAPK

Il existe 4 isoformes de p38MAPK: p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . p38 α est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus tandis que l'expression de autres trois isoformes est restreinte (P38 β dans le cerveau et le coeur, p38 γ dans le muscle squelettique et p38 δ dans les glandes

endocriniennes), ce qui suggère des fonctions spécialisées de ces isoformes (Cuadrado and Nebreda 2010). La p38MAPK est activée par certains agonistes mitogènes mais elle est généralement plus sensible aux stimuli de stress tels que : les rayons UV, le choc thermique, l'hypoxie, les ROS, les LPS (lipopolysaccharides) et les cytokines inflammatoires (IL-1 et TNF- α) (Rouse, Cohen et al. 1994, Zhang and Liu 2002, Cuadrado and Nebreda 2010). L'IL-1 et le TNF- α activent la p38MAPK en favorisant le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF au niveau des domaines intracellulaires de leurs récepteurs (Bradley and Pober 2001). Ceci induit l'activation de diverses MAPKKs impliquées dans l'activation des p38MAPKs. Les isoformes p38MAPKs sont également activées par les RCPGs et les protéines G associées (Goldsmith and Dhanasekaran 2007) ainsi que par les GTPases de la famille Rho (Rac1 et Cdc42) (Bagrodia, Derijard et al. 1995). MKK3 et MKK6 sont les principales MAPKKs responsables de l'activation de p38MAPK (Enslen, Raingeaud et al. 1998) suite à une double phosphorylation (Thr et Tyr) du motif conservé Thr-Gly-Tyr (TGY) situé dans la boucle d'activation de p38MAPK (Raingeaud, Gupta et al. 1995). MKK3/6 sont activées par multiples MAPKKs à savoir: MEKK1/2/3, MLK2 /3, ASK1, Tpl2, TAK1 et TAO1/2 (Cuadrado and Nebreda 2010). Dans les cellules quiescentes, p38MAPK est localisée dans le noyau et le cytoplasme mais après stimulation, elle s'accumule soit au cytoplasme (Ben-Levy, Hooper et al. 1998) ou au noyau (Wood, Thornton et al. 2009) selon le type de stimulus. La p38MAPK peut activer et phosphoryler un grand nombre de substrats dans le cytoplasme (cPLA2, MNK1/2, MK2/3, HuR, Bax et Tau) et le noyau (Elk-1, p53, ATF1/2/6, MEF2, GADD153, Ets1 et MSK1/2) (Cuadrado and Nebreda 2010).

La p38MAPK joue un rôle primordial dans les réponses immunitaires, normales et inflammatoires (Raingeaud, Gupta et al. 1995), en induisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires soit par l'activation des facteurs de transcription, particulièrement le NF- κ B (Olson, Hedrick et al. 2007) ou par la stabilisation de leurs ARNm et l'activation de leur traduction. Ceci implique MNK1 (Buxade, Parra-Palau et al. 2008) et MK2/3 (Ronkina, Kotlyarov et al. 2008). Le rôle des p38MAPKs dans la prolifération et la survie cellulaires est critique et parfois contradictoire dépendamment du type cellulaire et du stimulus. En effet, la p38MAPK peut réguler négativement la progression du cycle cellulaire à deux niveaux: la transition G1/S (Pillai, Sapna et al. 2011) et G2/M (Takenaka, Moriguchi et al. 1998) par un

certain nombre de mécanismes comprenant la régulation négative des cyclines et la régulation positive des inhibiteurs des CDKs (Lavoie, L'Allemain et al. 1996, Kim, Mercer et al. 2002). Mais elle peut aussi induire la prolifération dans certains types cellulaires (Crawley, Rawlinson et al. 1997, Chen, Mayer et al. 2009). Pour ce qui est de la survie cellulaire, bien que de nombreuses études aient rapporté des fonctions de pro-survie pour la p38MAPK (Phong, Van Horn et al. 2010, Gutiérrez-Uzquiza, Arechederra et al. 2012), beaucoup l'ont associé avec l'induction de l'apoptose dans des conditions de stress (Sarkar, Su et al. 2002, Porras, Zuluaga et al. 2004, Cai, Chang et al. 2006). Ces effets peuvent impliquer des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels qui affectent les récepteurs de la mort, les voies de survie ou les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Cuenda and Rousseau 2007). La p38MAPK est également impliquée dans la différenciation et la migration cellulaire (Cuenda and Rousseau 2007).

2.5.3. JNK

Il existe trois isoformes de JNK: JNK1, JNK2 et JNK3. JNK1 et JNK2 ont une large distribution tissulaire alors que JNK3 semble être localisée principalement aux neurones, aux testicules et au coeur (Bode and Dong 2007). Semblablement à p38MAPK, les isoformes de JNK sont fortement activées en réponse aux diverses conditions de stress à savoir: le choc thermique, les rayons UV, les ROS, les dommages de l'ADN, les cytokines et d'une façon moins étendue par des facteurs de croissance, certains ligands des RCPGs et le sérum (Bogoyevitch, Ngoei et al. 2010). L'activation de JNK nécessite une double phosphorylation des résidus Thr et Tyr dans le motif conservé Thr-Pro-Tyr (TPY) situé dans la boucle d'activation. Les MAPKKs qui catalysent cette réaction sont MKK4 et MKK7 qui semblent coopérer dans la phosphorylation et l'activation des JNKs (Lawler, Fleming et al. 1998). MKK4/7 sont phosphorylées et activées par plusieurs MAPKKs incluant: MEKK1/2/3/4, MLK1/2/3, Tpl-2, DLK, TAO1/2, TAK1 et ASK1/2 (Kyriakis and Avruch 2001, Wagner and Nebreda 2009). Comme dans le cas d'ERK1/2 et p38MAPK, une proportion de JNK activée migre du cytoplasme au noyau après stimulation (Mizukami, Yoshioka et al. 1997). Le facteur de transcription c-Jun est un substrat bien identifié de JNK; elle le phosphoryle sur le résidu

Ser 63/73 (Weston and Davis 2002). Certaines études ont montré des différences fonctionnelles entre JNK1 et JNK2 concernant la régulation de c-Jun et de la prolifération (Sabapathy, Hochedlinger et al. 2004) mais des données plus récentes indiquent que JNK1 et JNK2 sont tous les deux des régulateurs positifs de l'expression de c-Jun et de la prolifération cellulaire (Jaeschke, Karasarides et al. 2006). D'autres facteurs de transcription sont phosphorylés par JNK tels que: p53, ATF-2, Elk-1, c-Myc, NF-ATc1, HSF-1, STAT3 et JunB (Raman, Chen et al. 2007, Bogoyevitch, Ngoei et al. 2010).

JNK1/2 jouent ainsi un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération cellulaire grâce à l'activation de c-Jun et la formation du complexe AP-1 qui induit la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S comme la cycline D1 (Jaeschke, Karasarides et al. 2006). La voie JNK1/2 est également impliquée dans la différenciation hématopoïétique (Dong, Yang et al. 1998) ainsi que dans la réponse apoptotique aux stress cellulaires (Dhanasekaran and Reddy 2008). Par exemple, les fibroblastes isolées à partir des souris knockout JNK1^{-/-} / JNK2^{-/-} sont résistantes à l'apoptose induite par les agents endommageant de l'ADN et aux rayons UV. Cette résistance est associée à l'inhibition de la libération du cytochrome C indiquant un rôle pour JNK dans la voie apoptotique intrinsèque (Tournier, Hess et al. 2000).

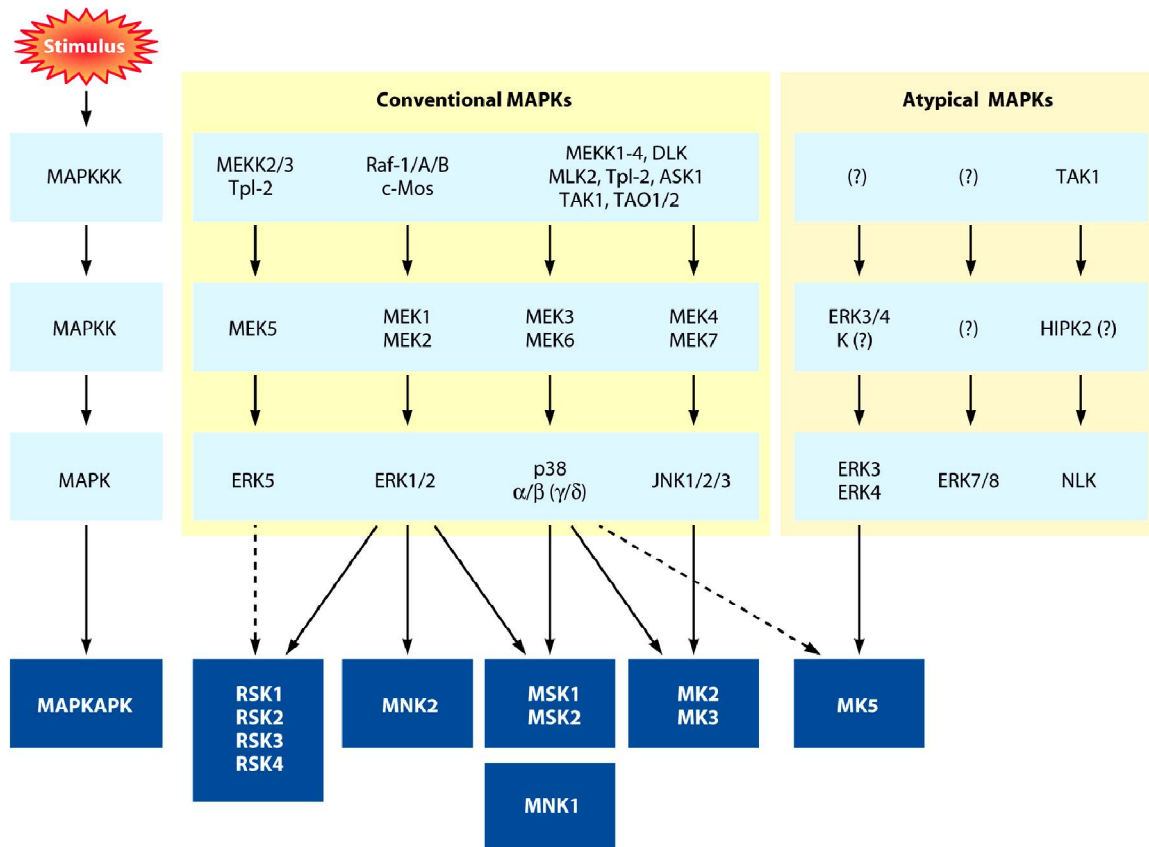


Figure 10. La cascade des MAP Kinases

Les mitogènes, les cytokines et les différents stress cellulaires favorisent l'activation des différentes voies MAPK, qui à leur tour phosphorylent et activent les cinq sous-groupes de MAPKAPK, y compris RSK, MSK, MNK, MK2/3 et MK5. Les lignes pointillées indiquent que, bien que signalée, la régulation du substrat par la kinase respective reste à démontrer. Les isoformes γ et δ de p38 sont entre parenthèses pour indiquer qu'elles n'ont pas été montrées pour favoriser l'activation de MAPKAPK (Cargnello and Roux 2011).

2.6. La voie mTOR

mTOR est la cible de la rapamycine, un macrolide produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*, qui a d'abord été identifié par ses larges propriétés antiprolifératives. Au début des années 1990, mTOR1 et mTOR2 ont été identifiés comme médiateurs des effets toxiques de la rapamycine sur la levure (Cafferkey, Young et al. 1993, Kunz, Henriquez et al. 1993). mTOR est une Ser/Thr Kinase qui interagit avec plusieurs protéines pour former deux complexes distincts: le complexe mTOR1 (mTORC1) et le complexe mTOR2 (mTORC2).

mTORC1 et mTORC2 ont une sensibilité différente à la rapamycine et des voies de signalisation en amont et en aval spécifiques à chacun. mTORC1 est le mieux caractérisé parmi les deux. Il détecte et intègre plusieurs signaux intra- et extracellulaires (les facteurs de croissance, le stress, l'état énergétique, l'oxygène et les acides aminés) pour contrôler de nombreux processus cellulaires tels que la synthèse protéique, la synthèse des lipides, l'autophagie, la biogenèse des ribosomes et des mitochondries. Ainsi, mTORC1 joue un rôle clé dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire.

2.6.1. mTORC1

2.6.2. La régulation de mTORC1

La régulation du mTORC1 dépend principalement de la GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain) et les protéines TSC1/2 (Tuberous sclerosis 1/2). Rheb liée au GTP interagit directement avec mTORC1 et stimule fortement son activité kinase tandis que TSC1/2 régule négativement mTORC1 en agissant comme une GAP pour la GTPase Rheb favorisant son maintien à l'état inactif lié au GDP (Inoki, Li et al. 2003, Tee, Manning et al. 2003).

TSC1/2 intègre la plupart des signaux extracellulaires qui signalent au mTORC1 incluant les facteurs de croissances (l'insuline, l'IGF-1, le PDGF, l'EGF, etc.) et les agonistes des RCPGs qui activent les voies PI3K/AKT et Ras/MAPK. Les kinases effectrices de ces voies y compris AKT, ERK1/2 et RSK1 phosphorylent directement le complexe TSC1/2 pour l'inactiver permettant ainsi l'activation de mTORC1 (Inoki, Li et al. 2002, Manning, Tee et al. 2002, Roux, Ballif et al. 2004, Ma, Chen et al. 2005). L'AKT peut aussi signaler à mTORC1 indépendamment de TSC1/2 en phosphorylant PRAS40, l'inhibiteur endogène de mTORC1, provoquant sa dissociation du complexe (Vander Haar, Lee et al. 2007, Wang, Harris et al. 2007). mTORC1 est également sensible au niveau énergétique de la cellule. Ceci implique l'AMPK (AMP-activated protein kinase), qui est inactive en présence des nutriments et des niveaux élevés d'ATP mais fortement activée pendant la diminution des réserves énergétiques de la cellule et en réponse à d'autres stress tel que l'hypoxie et le dommage à l'ADN. Une fois activée, l'AMPK phosphoryle et active TSC1/2 induisant l'inhibition du mTORC1 (Inoki, Zhu

et al. 2003), mais il peut aussi inhiber mTORC1 via la phosphorylation de raptor, une protéine partenaire de mTOR1 (Gwinn, Shackelford et al. 2008). La GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) peut également activer le TSC1/2 et inhiber mTORC1 pendant le stress énergétique (Inoki, Ouyang et al. 2006). L'hypoxie induit la transcription du REDD1 (transcriptional regulation of DNA damage response 1) qui active TSC2 indépendamment de l'AMPK et de la GSK-3 β (Brugarolas, Lei et al. 2004). La GTPase Rheb peut aussi être inhibée par la p38MAPK suite à un stress énergétique indépendamment de TSC2 (Zheng, Wang et al. 2011). Les acides aminés, en particulier la leucine et l'arginine, activent mTORC1 et leur présence est indispensable à l'activation de mTORC1 par tout signal en amont y compris les facteurs de croissance (Blommaart, Luiken et al. 1995, Hara, Yonezawa et al. 1998). Les acides aminés agissent indépendamment de TSC1/2 (Smith, Finn et al. 2005) et nécessitent plutôt la GTPase Rag qui provoque la translocation du mTORC1 vers les membranes des lysosomes où il est activé par Rheb (Kim, Goraksha-Hicks et al. 2008, Sancak, Bar-Peled et al. 2010). Finalement, l'acide phosphatidique (PA) a également été identifié comme un activateur de mTORC1 (Fang, Vilella-Bach et al. 2001).

2.6.3. Les fonctions de mTORC1

La synthèse protéique: La principale fonction bien caractérisée de mTORC1 est le contrôle la synthèse protéique. mTORC1 phosphoryle directement deux protéines régulatrices de la synthèse protéique: S6K1 (S6 kinase 1) et 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein) (Ma and Blenis 2009). La phosphorylation de 4EBP1 entraîne sa dissociation de la protéine eIF4E permettant à ce dernier de former un complexe avec eIF4F pour initier la traduction de type "cap-dependent translation". 4EBP1 peut aussi être phosphorylé par CDK1 (cyclin dependent kinase 1) indépendamment de mTOR pour maintenir la synthèse protéique pendant la mitose (Shuda, Velasquez et al. 2015). L'activation de S6K1 induit, via multiples effecteurs, l'augmentation de la biogenèse des ARNm, l'initiation de la traduction et le processus d'élongation (Ma and Blenis 2009). La S6K1 est l'isoforme la mieux caractérisée mais il existe aussi l'isoforme S6K2 qui a une localisation nucléaire et dont la fonction n'est pas encore bien comprise (Pardo and Seckl 2013). mTORC1

contrôle la traduction des ARNm de type 5' TOP (5' Terminal Oligopyrimidine mRNA) qui codent pour la plupart des protéines de la machine de traduction, ceci est indépendant de S6K1 et de son substrat, la protéine ribosomale S6 (Tang, Hornstein et al. 2001) et le mécanisme reste toujours inconnu. mTORC1 stimule également la biogenèse des ribosomes par deux mécanismes: 1/ l'activation de l'élément régulateur TIF-1A (tripartite motif-containing protein-24) ce qui favorise son interaction avec l'ARN Polymérase I (Pol I) et l'expression de l'ARN ribosomal (ARNr) (Mayer, Zhao et al. 2004) et 2/ la phosphorylation et l'inhibition de Maf1, un répresseur Pol III, ce qui induit la transcription de l'ARNr 5S et l'ARN de transfert (ARNt) (Kantidakis, Ramsbottom et al. 2010, Shor, Wu et al. 2010). Le rôle global de mTORC1 dans la régulation de la synthèse protéique est hautement significatif puisque les inhibiteurs spécifiques qui bloquent complètement la fonction mTORC1, réduisent fortement le taux de synthèse protéique et de prolifération dans les cellules en culture (Yu, Toral-Barza et al. 2009).

La synthèse des lipides: La prolifération cellulaire dépend aussi de la capacité des cellules à synthétiser les lipides. mTORC1 stimule la synthèse *de-novo* des lipides membranaires via le facteur de transcription SREBP1/2 (sterol regulatory element-binding protein 1/2) (Porstmann, Santos et al. 2008) qui induit l'expression des gènes lipogènes nécessaires à la synthèse du cholestérol et des acides gras (Wang, Ducker et al. 2011). Ce mécanisme pourrait impliquer S6K1 (Duvel, Yecies et al. 2010, Li, Ogawa et al. 2011). De plus, mTORC1 phosphoryle la Lipine-1 empêchant son entrée dans le noyau où elle peut réguler négativement les niveaux et la fonction de SREBP1/2 (Peterson, Sengupta et al. 2011). mTORC1 favorise également l'expression et l'activité du récepteur PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), qui est le régulateur maître de l'adipogenèse (Kim and Chen 2004).

L'autophagie: L'autophagie est un processus cellulaire de dégradation des organites et des protéines. Elle permet le recyclage des organites endommagés et l'adaptation cellulaire à des conditions de starvation (la faim). L'autophagie est négativement régulée par mTORC1. L'inhibition du mTORC1 provoque la formation des autophagosomes qui englobent les protéines cytoplasmiques et les organites puis fusionnent avec les lysosomes où ces composantes cellulaires seront dégradées. Les acides aminés et les acides gras générés sont

ensuite recyclés (Levine and Kroemer 2008). mTORC1 semble réguler l'autophagie par deux principaux mécanismes: **1/** il phosphoryle directement la protéine ULK1 et inhibe la formation du complexe kinase ULK1/Atg13/FIP200 (unc-51-like kinase 1/mammalian autophagy-related gene 13/focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) qui favorise la formation d'autophagosomes et l'initiation de l'autophagie (Ganley, Lam et al. 2009) **2/** il inhibe l'expression des protéines autophagiques, particulièrement l'Atg7 (Autophagy-related protein 7) (Sciarretta, Zhai et al. 2012) qui est nécessaire pour l'initiation du processus autophagique (Levine and Kroemer 2008). Ce dernier mécanisme implique l'inhibition des facteurs de transcription p73 (Rosenbluth, Mays et al. 2008) et TFEB (Martina, Chen et al. 2012), qui sont des inducteurs de l'expression des protéines autophagiques.

Le métabolisme cellulaire: mTORC1 régule positivement le métabolisme cellulaire et la production d'ATP. Il augmente la glycolyse en stimulant la transcription et la traduction du facteur HIF1 α (hypoxia inducible factor 1 α) qui induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la glycolyse (Hudson, Liu et al. 2002, Duvel, Yecies et al. 2010). mTORC1 augmente également les niveaux d'ADN mitochondrial et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif, en partie par l'augmentation de l'association nucléaire entre PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α) et le facteur de transcription YY1 (Ying-Yang 1). Ce complexe transcriptionnel régule positivement la biogenèse mitochondriale et la fonction oxydative (Cunningham, Rodgers et al. 2007).

2.6.4. mTORC2

La voie mTORC2 est moins caractérisée et moins étudiée que celle de mTORC1. Contrairement à mTORC1, mTORC2 est insensible à la rapamycine (Jacinto, Loewith et al. 2004) mais le traitement à long terme par la rapamycine pourrait réduire la signalisation mTORC2 dans certaines lignées cellulaires (Sarbasov, Ali et al. 2006). mTORC2 peut être activé par l'insuline et les facteurs de croissance via une voie moins bien caractérisée impliquant la PI3K, le complexe TSC1-TSC2 et l'interaction avec les ribosomes (Huang, Dibble et al. 2008, Zinzalla, Stracka et al. 2011) mais il est relativement insensible au manque de nutriments (Kapahi, Chen et al. 2010). Les fonctions du mTORC1 et mTORC2 peuvent se

chevaucher. En fait, mTORC1 semble inhiber mTORC2 en provoquant la phosphorylation de sa protéine partenaire, rictor via S6K1 (substrat de mTORC1) (Dibble, Asara et al. 2009). De même, l'AKT, qui est en amont du mTORC1, peut être phosphorylé par mTORC2, en particulier en réponse à l'insuline (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Cependant, dans certains types cellulaires, la phosphorylation d'AKT est indépendante de mTORC2 (Xie, Zhang et al. 2011). Outre l'AKT, les substrats de mTORC2 comprennent le PKC- α (protein kinase C- α) et le SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1). mTORC2, via ces effecteurs, régule la survie, la croissance et la prolifération cellulaire.

Par son contrôle de tous ces processus cellulaires, la voie mTOR joue un rôle central dans la survie et la prolifération cellulaire et son inhibition s'est montrée comme une stratégie thérapeutique efficace pour prévenir la resténose des artères coronariennes; les endoprothèses à élution qui libèrent la rapamycine et ses analogues sont efficacement utilisées tel que mentionné précédemment (Morice, Serruys et al. 2002, Ruygrok, Desaga et al. 2007). De plus, des études cliniques montrent que les inhibiteurs de mTOR sont efficaces pour prévenir ou au moins stabiliser l'athérosclérose (Martinet, De Loof et al. 2014). Néanmoins, des effets indésirables incluant une dyslipidémie et une hyperglycémie sont associés avec ses drogues (Martinet, De Loof et al. 2014). Finalement, des études récentes *in-vivo* indiquent que l'inhibition de mTOR réduit significativement l'hypertension induite par le sel chez des rats (Kumar and Cowley 2017).

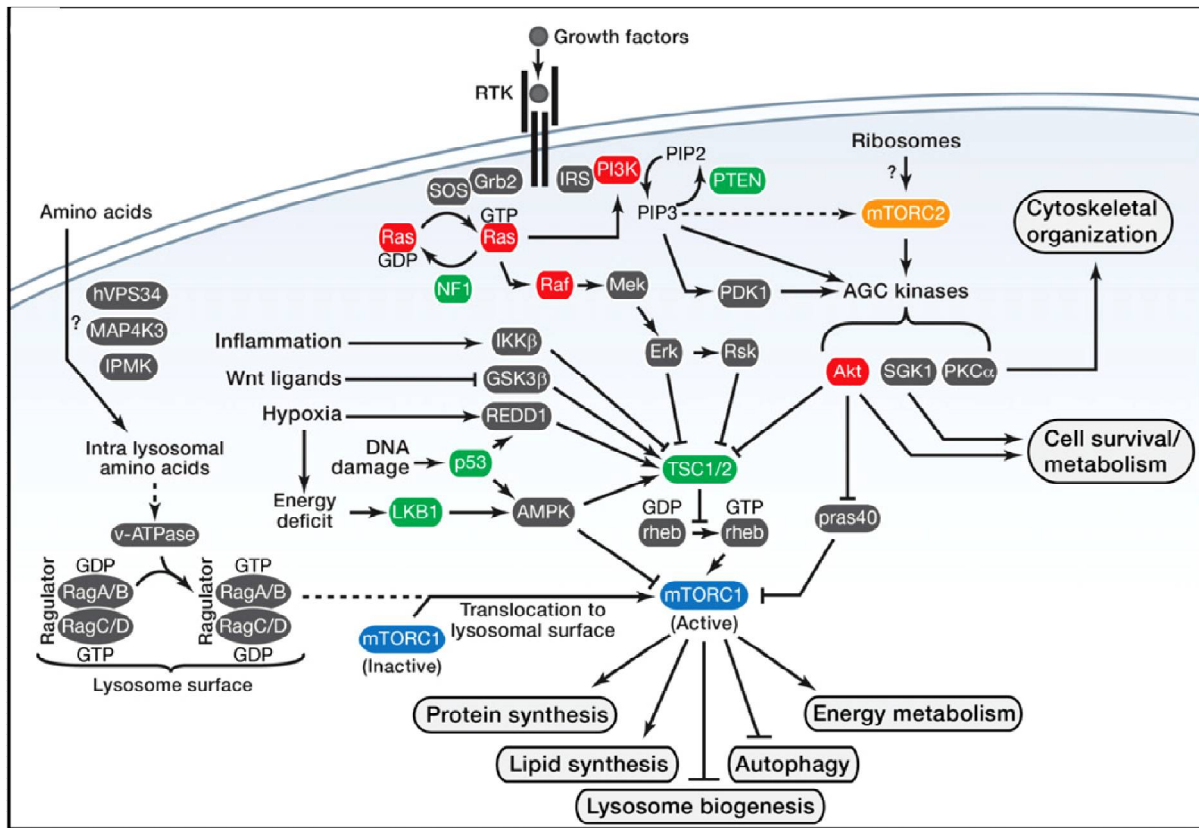


Figure 11. La signalisation mTOR

Les nœuds de signalisation qui régulent mTORC1 et mTORC2: les signaux régulateurs de mTORC1 comprennent les facteurs de croissance, les acides aminés, le stress, le statut énergétique et l'oxygène. Lorsqu'il est actif, mTORC1 favorise la synthèse des protéines, la lipogenèse et le métabolisme énergétique et inhibe l'autophagie et la biogenèse des lysosomes. mTORC2 est activé par des facteurs de croissance et régule l'organisation du cytosquelette, la survie et le métabolisme cellulaire. Sur cette figure, les protéines représentées en rouge sont oncogènes et celles en vert sont des suppresseurs de tumeurs (Laplane and Sabatini 2012).

3. Le cycle cellulaire

En présence d'un signal prolifératif, les cellules sortent de la phase de quiescence G0, appelée aussi phase de repos, et entament un cycle de division, appelé cycle cellulaire. Certaines cellules se divisent très souvent et ne demeurent dans la phase G0 que pour une courte période comme les cellules épithéliales alors que d'autres cellules peuvent rester en phase G0 pendant des années ou à vie comme les cellules nerveuses où elles accomplissent toutes leurs fonctions normales sans toutefois se diviser. Le cycle cellulaire comporte 4 phases successives:

La phase G1: c'est la première phase de croissance. La cellule, en plus d'assurer ses fonctions normales, commence à croître et à se préparer pour la division en fabriquant plus de protéines et de composantes cellulaires (organites). Cette phase est d'une durée très variable pouvant s'étaler entre 8 heures et plusieurs jours, voire des semaines ou des mois. Durant cette phase, la cellule assure la synthèse de tout le matériel nécessaire à la réplication d'ADN.

La Phase S: c'est la phase de réplication de l'ADN grâce à l'ADN polymérase. Ce processus permet de dupliquer le matériel génétique contenu dans les chromosomes afin de le transmettre aux deux cellules filles par la suite. Cette phase dure de 6 à 8 heures environ.

La Phase G2: c'est la seconde phase de croissance. La cellule continue sa croissance et synthétise les protéines nécessaires à la division. Cette phase dure de 2 à 5 heures environ.

La mitose: c'est la phase de division cellulaire proprement dite. La cellule se divise en deux cellules filles identiques au cours d'un processus comportant 6 étapes: la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytokinèse.

Le cycle cellulaire est régulé par les kinases CDKs (cyclin dependent kinases) et leurs protéines activatrices, les cyclines, qui coordonnent les transitions entre les différentes phases.

3.1. Les CDKs et les cyclines

Les CDKs (cyclin dependent kinases) sont des Ser/Thr kinases. Ce sont des enzymes hétérodimériques avec deux sous-unités : la protéine kinase, CDK (la sous-unité catalytique)

et la cycline (la sous-unité régulatrice) (Crosby 2007). Généralement, les niveaux de la protéine kinase (CDK) sont relativement constants alors que ceux de la cycline oscillent durant le cycle cellulaire. La kinase est complètement inactive sans sa cycline partenaire. L'expression de la cycline augmente jusqu'à atteindre un seuil d'activation de la Kinase partenaire. En plus de la liaison de la cycline, l'activation de l'holoenzyme nécessite la phosphorylation d'un résidu clé dans la boucle d'activation de la sous-unité kinase (par exemple: le Thr160 de la CDK2) (Harper and Elledge 1998). L'inactivation du complexe enzymatique CDK-cycline se fait par plusieurs mécanismes: la dégradation spécifique de la cycline par la voie ubiquitine-protéasome (Peters 2006), l'association à une protéine inhibitrice ou une phosphorylation inhibitrice (comme Tyr15 et Thr14 du CDK1) (Kellogg 2003). Les CDKs déclenchent les transitions entre les différentes phases du cycle en phosphorylant une multitude de substrats distincts. CDK1 et CDK2 peuvent lier les cyclines de type A, B, D et E, tandis que CDK4 et CDK6 ne s'associent qu'avec les cyclines de type D. Selon le modèle classique du contrôle du cycle cellulaire, CDK4/CDK6-cycline D régule les événements au début de la phase G1, CDK2-cycline E déclenche la phase S, CDK2-cycline A et CDK1-cycline A régulent la fin de la phase S et la phase G2 et CDK1-cycline B est le régulateur maître de la mitose (**Fig 12**). Toutefois, des études génétiques chez la souris ont mis en question ce modèle classique qui implique que chaque phase du cycle est régulée par un/des CDK(s) spécifique(s). L'utilisation des souris knockout a montré que seul la CDK1 est indispensable au cycle cellulaire. À l'inverse, la CDK2 est dispensable sauf pour la méiose, la CDK4 est nécessaire seulement dans le pancréas et la CDK6 est importante seulement pour l'érythropoïèse (Hochegger, Takeda et al. 2008). CDK1 peut être activée par les cyclines de l'interphase (D, E, A) aussi bien que les cyclines mitotiques (B) et elle est capable de réguler seule le cycle cellulaire contrairement aux autres CDKs qui ne peuvent pas la remplacer (Santamaria, Barriere et al. 2007). Il existe aussi d'autres CDKs/cyclines moins caractérisés tels que CDK3 (lie les cycline A,C et E), CDK5 (lie les cyclines D,E et I), CDK7 (lie les cyclines de type H) et CDK11 (lie les cyclines D et L) (Malumbres 2011).

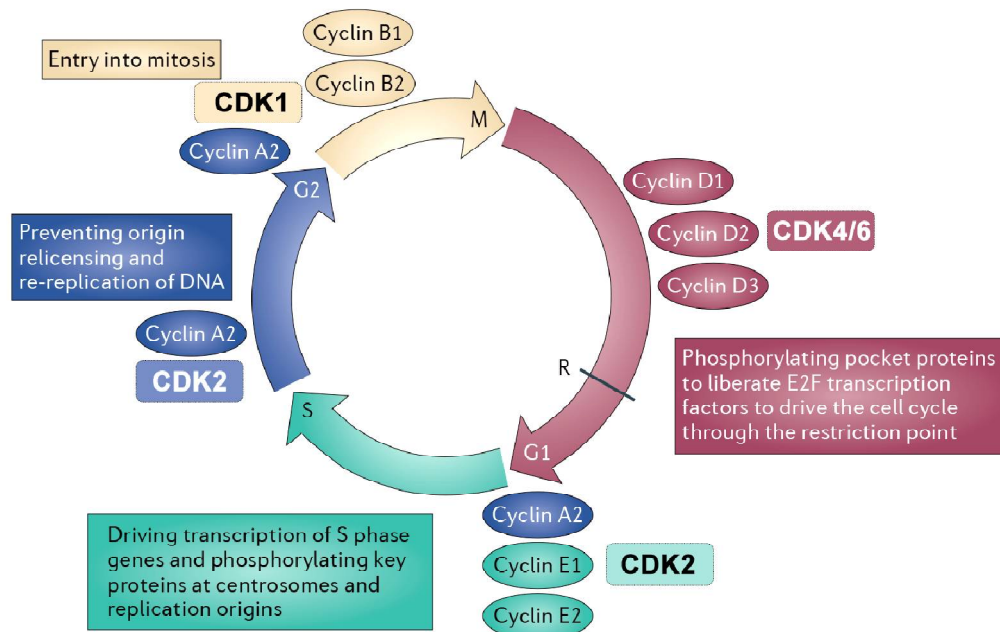


Figure 12. CDKs, cyclines et le cycle cellulaire

Au fur et à mesure que la cellule progresse dans le cycle cellulaire, des vagues successives d'activité CDK-cycline augmentent et diminuent lorsque les cyclines sont synthétisées puis dégradées par le protéasome après leur ubiquitination. Les différents complexes CDK-cycline exercent des rôles spécialisés. Les cyclines de type D sont synthétisées en réponse à des signaux mitogéniques et se lie à CDK4 (et/ou CDK6) pour phosphoryler les protéines de poche telles que le Rb. CDK2-cycline E favorise la transition G1/S pour déclencher la réplication de l'ADN et initier la duplication des centrosomes. Le complexe CDK2-cycline A a une plus longue durée de vie et il collabore avec CDK2-cycline E pour réguler positivement et négativement la réplication de l'ADN de sorte que l'ADN ne soit répliqué qu'une seule fois. La dernière vague de l'activité CDK1-cycline B réorganise la cellule pour la mitose (Moore 2013).

3.2. La transition G1/S

Dans les cellules quiescentes, les protéines de poche: Rb, p107 et p130 se lient aux facteurs de transcription E2F pour réprimer l'expression des gènes du cycle cellulaire. Les protéines de poche empêchent les protéines E2F activatrices (E2F1, E2F2 et E2F3) d'activer la transcription ou fonctionnent comme corépresseurs des protéines E2F répresseurs (E2F4) (Bertoli, Skotheim et al. 2013). Les signaux mitogéniques tels que la voie MAPK induisent l'expression des cyclines de type D (D1, D2 et D3) qui lient et activent préférentiellement

CDK4 et CDK6 au début de la phase G1 (Malumbres and Barbacid 2001). La phosphorylation des protéines de poche (Rb, p107 et p130) par les complexes CDK4-cycline D/CDK6-cycline D résulte en leur inactivation et la libération des facteurs de transcription E2F. Ceci induit la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S, y compris le gène codant pour la cycline E. La cycline E se lie ensuite au CDK2 et le complexe CDK2-cycline E phosphoryle les protéines de poche, fournissant ainsi une boucle de rétroaction positive conduisant à leur inactivation complète (Lundberg and Weinberg 1998, Harbour, Luo et al. 1999) et la potentialisation de l'expression des gènes induits par l'E2F. La disponibilité des cyclines E pendant le cycle cellulaire est très limitée, elles sont dégradées pendant les premiers stades de la synthèse de l'ADN (phase S) après avoir déclenché la transition G1/S (Hochegger, Takeda et al. 2008). Les cyclines A prennent le relai ensuite pour activer CDK2 au cours des dernières étapes de la phase S et pendant la phase G2 du cycle.

3.3. La transition G2/M

La transition G2/M est orchestrée par la CDK1. Au cours de l'interphase, le complexe CDK1-cycline B s'accumule dans le cytoplasme et dans les centrosomes. Il est maintenu inactif par les kinases Wee1 et myt1. Une fois que les cellules ont achevé la réplication de l'ADN (phase S) et qu'elles se sont préparées pour la mitose (phase G2), le CDK1-cycline B est activé par les phosphatases Cdc25, qui enlèvent les phosphates inhibiteurs des résidus Thr14 et Tyr15 induisant ainsi l'entrée en mitose. Le déclencheur initial de cette réaction est inconnu, mais cette dernière semble se produire aux centrosomes (Jackman, Lindon et al. 2003). Ceci est suivi par la séparation des centrosomes due à l'activation de la protéine motrice, Eg5 par le complexe CDK1-cycline B (Blangy, Lane et al. 1995). CDK1-cycline B agit dans une boucle de rétroaction positive en augmentant l'activité de Cdc25 et en inhibant ses kinases inhibitrices, assurant ainsi une auto-activation très rapide (Xiong and Ferrell 2003). D'autres kinases mitotiques telles que Aurora A et PLK1 (polo-like kinase 1) pourraient être impliquées dans l'activation du CDK1 au cours de la transition G2/M (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2001, Hirota, Kunitoku et al. 2003).

3.4. La mitose

Une fois actif, une grande partie du CDK1-cycline B migre au noyau où il coordonne la majorité des événements mitotiques. Brièvement, CDK1-cycline B phosphoryle les lamines nucléaires provoquant la rupture de l'enveloppe nucléaire et induit la condensation des chromosomes. L'activité du CDK1-cycline B est également nécessaire pour la formation du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes à l'équateur de la cellule pour former la plaque de métaphase. Le SAC (spindle assembly checkpoint), un système de contrôle composé de complexes protéiques assure que tous les chromosomes sont correctement attachés aux microtubules du fuseau mitotique. La satisfaction du SAC permet l'activation de l'ubiquitine ligase E3, APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) qui catalyse l'ubiquitination de la cycline B puis sa dégradation rapide par les protéasomes, ce qui induit l'inactivation du CDK1, la ségrégation chromosomique et la sortie de la mitose. CDK1 régule tous ces événements mitotiques en coordination avec d'autres kinases, particulièrement Aurora B et PLK1. La mitose peut être divisée en 6 phases (**Fig 13**):

1- La prophase: les chromosomes deviennent fortement condensés, les centrosomes commencent à se séparer et le fuseau mitotique commence à se développer. La rupture de l'enveloppe nucléaire manifeste la transition entre la prophase et la prométaphase.

2- La prométaphase: l'enveloppe nucléaire disparaît complètement et les chromosomes deviennent accessibles aux microtubules du fuseau mitotique. Les fibres K (kinetochore fibres), qui sont des faisceaux de microtubules, relient les kinétochores des chromosomes aux deux centrosomes opposés de la cellule. Les kinétochores sont des complexes protéiques situés au niveau de la région externe des centromères des chromosomes mitotiques. Il existe deux kinétochores par chromosome permettant ainsi une liaison bi-orientée (bipolaire) de ce dernier.

3- La métaphase: tous les chromosomes sont alignés à l'équateur de la cellule. Les microtubules sont orientés de façon uniforme avec leurs extrémité (-) au centrosome et leurs extrémités (+) s'étendant vers l'équateur et liant les chromosomes par leurs kinétochores. Chaque chromosome est constitué de deux chromatides sœurs, qui sont reliées ensemble par le complexe cohésine.

4- L'anaphase: la ségrégation des chromosomes est déclenchée lorsque la cohésine est dégradée par la séparase. Les deux chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule grâce aux microtubules du fuseau mitotique. Un fuseau central de microtubules apparaît au milieu.

5- La télophase: l'enveloppe nucléaire commence à se reformer et les chromosomes commencent à se décondenser.

6- La cytokinèse: la division du cytoplasme et la formation de deux cellules filles identiques marque la fin de la division cellulaire.

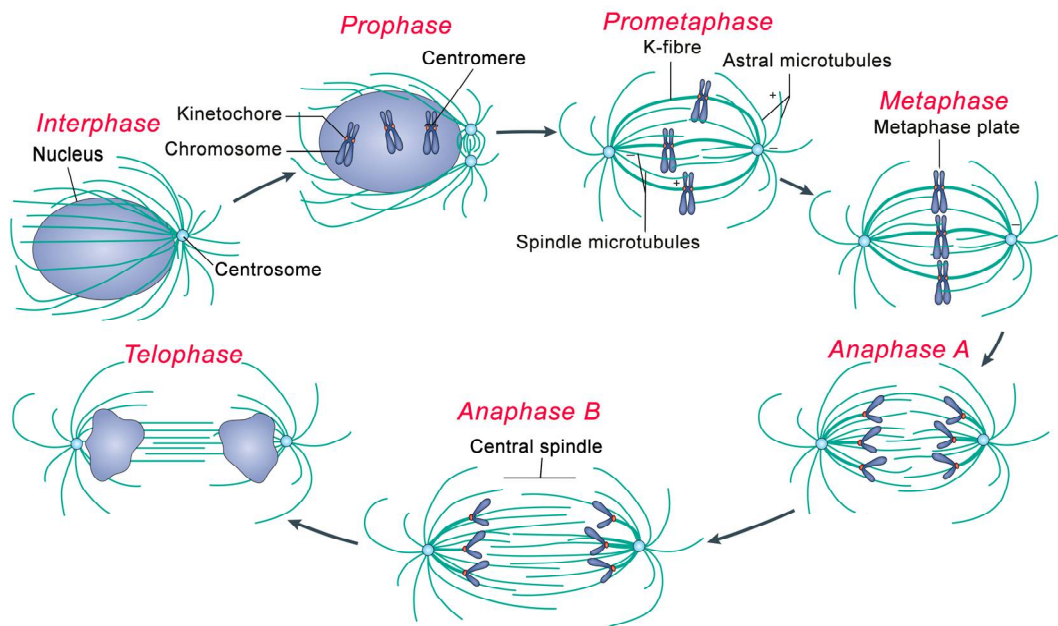


Figure 13. Les phases de la mitose

La mitose peut être divisée en phases individuelles: Pendant la prophase, les chromosomes deviennent condensés et les centrosomes commencent à se séparer. La rupture de l'enveloppe nucléaire marque la transition entre la prophase et la prométaphase. Au cours de la prométaphase, les fibres "kinétochore" ou fibres K (des faisceaux de microtubules stabilisés) relient les microtubules du fuseau mitotique aux kinétochores des chromosomes, de sorte que les chromosomes peuvent s'aligner à l'équateur de la cellule, ce qui définit la métaphase. Le mouvement des chromosomes vers les pôles se produit pendant l'anaphase A et les deux pôles du fuseau se séparent pendant l'anaphase B. L'enveloppe nucléaire commence à se reformer et l'ADN commence à se décondenser pendant la télophase. Pendant la cytokinèse, le cytoplasme de la cellule se divise et les deux noyaux filles sont séparés en cellules individuelles (Walczak, Cai et al. 2010).

3.5. Les kinases mitotiques

3.5.1. CDK1

CDK1 est le régulateur maître de la mitose. Elle appartient à la famille CDK qui comprend 21 membres chez les mammifères (Malumbres, Harlow et al. 2009). Ils partagent tous un domaine catalytique conservé comprenant une poche liant l'ATP, un domaine de liaison à la cycline (domaine PSTAIRE dans le cas de CDK1) et une boucle T activatrice. La liaison de la cycline via l'hélice PSTAIRE va déplacer la boucle T et exposer l'interface de liaison du substrat. Des résidus critiques à l'intérieur du site actif se réalignent permettant ainsi la réaction de transfert de phosphate entre l'ATP et le substrat (Lim and Kaldis 2013). La CDK1 possède deux sites de phosphorylation qui régulent négativement son activité, les résidus Thr14 et Tyr15 et un site de phosphorylation activatrice, le résidu Thr 161. La phosphorylation du Thr161 par les kinases activatrices des CDKs (CAKs) facilite la liaison du substrat et augmente la stabilité du complexe pour permettre une activation maximale de CDK1 (Atherton-Fessler, Parker et al. 1993, Pavletich 1999). L'activité de CDK1 est inhibée par les inhibiteurs des CDKs, CKIs de la famille Cip/Kip (p21Cip1, p27Kip1 et p57Kip2). Ces derniers entrent en contact avec les deux sous-unités du complexe (CDK1 et la cycline) et inhibent les hétérodimères CDK1-cycline, ce qui donne un niveau supplémentaire de régulation négative des complexes déjà formés (Sherr and Roberts 1999).

L'entrée en mitose nécessite une activité accrue de la CDK1 associée à la cycline A et à la cycline B. Cependant, la cycline A pourrait être dispensable pour la mitose dans certaines lignées cellulaires (Kalaszczyńska, Geng et al. 2009). La cycline B est donc la principale sous-unité activatrice requise par CDK1 pour déclencher la mitose. Le niveau de la cycline B atteint son pic à la fin de la phase G2 (Brizuela, Draetta et al. 1989). Cependant, le complexe CDK1-cycline B reste inactif en raison des deux phosphorylations inhibitrices sur les résidus Thr14 et Tyr15 de CDK1 qui ont lieu pendant la phase S et G2 (Draetta, Piwnicka-Worms et al. 1987) afin de prévenir l'entrée prématurée en mitose (Krek and Nigg 1991). Les phosphorylations inhibitrices sont réalisées par deux kinases, Wee1 et Myt1. Wee1 phosphoryle le Tyr15 (McGowan and Russell 1993), tandis que Myt1 phosphoryle préférentiellement le Thr14 (Booher, Holman et al. 1997). Wee1 et Myt1 sont également phosphorylées et inhibées par

CDK1-cycline B pendant la mitose (Watanabe, Broome et al. 1995, Booher, Holman et al. 1997). La phosphatase à double spécificité, Cdc25 élimine les phosphorylations inhibitrices (Thr14 et Tyr15) de la CDK1 permettant ainsi son activation et l'entrée en mitose (Hoffmann, Clarke et al. 1993). De même, Cdc25 est phosphorylée et activée par CDK1-cycline B durant la mitose entraînant une boucle de rétroaction positive. L'entrée en mitose nécessite aussi l'inhibition des phosphatases PP2A-B55 par CDK1. Cette inhibition implique l'activation des kinases Greatwall, qui activent à leur tour les inhibiteurs des phosphatases (Gharbi-Ayachi, Labbé et al. 2010, Mochida, Maslen et al. 2010).

Le complexe CDK1-cycline B cible des centaines de substrats qui partagent la séquence consensus (S/T)PX(K/R) (Holt, Tuch et al. 2009) et il régule un grand nombre de processus cellulaires pendant la mitose. CDK1-cycline B favorise la séparation des centrosomes en phosphorylant la protéine motrice associée au centrosome, Eg5 juste avant l'entrée en mitose (Blangy, Lane et al. 1995). Dès l'entrée en mitose, il induit la condensation des chromosomes via la phosphorylation des histones (Meijer, Arion et al. 1989), de la condensine (Kimura, Hirano et al. 1998), du HMG-1 (high mobility group 1) (Nissen, Langan et al. 1991) et de la sous-unité RII α de PKA (Keryer, Yassenko et al. 1998, Collas, Le Guellec et al. 1999). CDK1-cycline B phosphoryle aussi les lamines nucléaires, le récepteur de la lamine B et le complexe du pore nucléaire induisant ainsi la rupture de l'enveloppe nucléaire au cours de la transition prophase/prométaphase (Heald and McKeon 1990, Brickner and Brickner 2011, Tseng and Chen 2011). Il contrôle aussi la dynamique des microtubules par la phosphorylation d'un certain nombre de régulateurs, y compris la tubuline β (Fourest-Lieuvain, Peris et al. 2006), les protéines associées aux microtubules comme la MAP4 (Microtubules Associated Protein 4) (Aizawa, Kamijo et al. 1991) et les protéines motrices des microtubules, les kinésines (d'Herin and Nigg 1995). CDK1-cycline B cible également les kinétochores non attachés et contribue à leur liaison aux microtubules (Chen, Zhang et al. 2008). La fragmentation du réseau Golgien pendant la mitose est aussi médiée par CDK1-cycline B via la phosphorylation de Nir2 (Litvak, Argov et al. 2004), GM130 (Lowe, Rabouille et al. 1998) et GRASP65 (Lin, Madsen et al. 2000). D'autres substrats font partie des cibles du complexe CDK1-cycline B, incluant des protéines impliquées dans la réplication d'ADN (MCM2, ribonucléotide réductase R2) (Chan, Persad et al. 1999, Montagnoli, Valsasina et al. 2006), la

traduction protéique (eEF-1) (Monnier, Bellé et al. 2001), la progression mitotique (Cdc20) (Yudkovsky, Shteinberg et al. 2000) et la sortie de la mitose (les phosphatases PP1) (Dohadwala, da Cruz e Silva et al. 1994). Enfin, une sortie réussie de la mitose nécessite l'inactivation de CDK1 par la dégradation de la cycline B, ce qui déclenche l'anaphase. Les phosphatases PP1 et PP2A sont maintenant actives et déphosphorylent les substrats ciblés par CDK1-cycline B pendant les premières étapes de la mitose (Wurzenberger and Gerlich 2011).

3.5.2. Les Kinases Aurora

Chez les mammifères, la famille Aurora comprend 3 membres: Aurora A, B et C (Nigg 2001). Ces kinases contiennent un domaine catalytique conservé et des domaines N-terminaux qui varient en séquence et en longueur. Malgré leur homologie de séquence, Aurora A et Aurora B affichent une localisation et des fonctions distinctes (Malumbres 2011).

Aurora A se localise au niveau des centrosomes de la fin de la phase S jusqu'à la fin de la mitose où elle est ubiquitinée par l'APC/C^{Cdh1} puis dégradée par les protéasomes. L'activation d'Aurora A nécessite la liaison de cofacteurs spécifiques (ex: Bora) conduisant à l'autophosphorylation du résidu Thr288 dans la boucle T activatrice (Littlepage, Wu et al. 2002). Aurora A participe à plusieurs processus nécessaires à la formation du fuseau mitotique, y compris la séparation des centrosomes et la dynamique des microtubules (Giet, Petretti et al. 2005, Barr and Gergely 2007).

Aurora B, appartient au complexe chromosomique passager (comprend aussi: Borealin, INCENP et Survivin) (Ruchaud, Carmena et al. 2007), qui s'enrichit aux centromères de la prométaphase jusqu'à la métaphase. Aurora B se localise au niveau du fuseau central pendant l'anaphase et se concentre au niveau du corps médian "midbody" durant la cytokinèse (Carmena and Earnshaw 2003, Ruchaud, Carmena et al. 2007). Aurora B est activée par autophosphorylation du résidu Thr232 dans la boucle T activatrice après sa liaison aux membres du complexe passager chromosomique (CPC). Ce dernier joue un rôle central dans la formation du fuseau mitotique et il est responsable du recrutement d'un grand nombre de protéines aux centromères et aux kinétochores, y compris les protéines internes du centromère (inner centromere proteins, INCENPs), les protéines qui régulent les attachements microtubule-kinétochore et les protéines impliquées dans le système SAC (Kelly and Funabiki

2009). Pendant la mitose, Aurora B phosphoryle l'histone H3 sur le résidu Ser10 et probablement le Ser28 (Goto, Yasui et al. 2002, Hirota, Lipp et al. 2005). De plus, elle phosphoryle et active la kinésine, MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin) qui est responsable de la dépolymérisation des extrémités plus des microtubules liant les kinétochores. Ainsi, Aurora B joue un rôle dans la déstabilisation des attachements microtubule-kinétochore qui sont incorrectes et l'activation du système SAC qui bloque la transition métaphase/anaphase jusqu'à ce que ces défauts de liaison microtubule-kinétochore soient corrigés (Ruchaud, Carmena et al. 2007). Le modèle largement accepté suggère que la phosphorylation des substrats situés au kinétochore par Aurora B située au centromère dépend de la distance entre le kinétochore et le centromère. La liaison bi-orientée des kinétochores aux microtubules émanant des pôles opposés de la cellule crée une tension qui étire le centromère et les kinétochores (**Fig 14**). Ainsi, les deux kinétochores s'éloignent du centre du centromère où se localise Aurora B, ce qui limite l'accès de cette dernière à ces substrats (Liu, Vader et al. 2009).

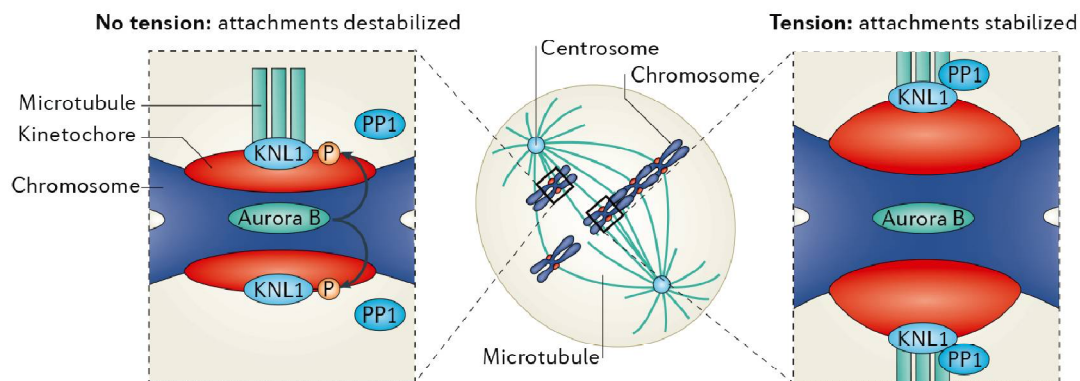


Figure 14. Aurora B et le modèle de tension centromérique

Une cellule entre la prométaphase et la métaphase est représentée au centre. Certains chromosomes sont attachés aux microtubules à partir d'un seul kinétochore (encadré à gauche) et d'autres sont correctement alignés le long de la plaque de métaphase (encadré à droite). Pour les centromères qui ne sont pas sous tension, Aurora B située à la région interne du centromère est à proximité immédiate du kinétochore externe, de sorte qu'elle peut phosphoryler les composantes externes du kinétochore telles que KNL1, pour supprimer la liaison de PP1. Une activité élevée d'Aurora B et une faible activité de PP1 au kinétochore externe déstabilisent la fixation des microtubules en phosphorylant des substrats supplémentaires, tels que le NDC80. L'attachement des deux kinétochores sœurs aux pôles opposés du fuseau étire le kinétochore et le centromère, ce qui sépare physiquement Aurora B des substrats au kinétochore (Wurzenberger and Gerlich 2011).

Finalement, pendant la cytokinèse, Aurora B se localise au niveau de l'anneau de "midbody" où elle contrôle la dernière étape de la mitose, l'abscission (Guse, Mishima et al. 2005, Steigemann, Wurzenberger et al. 2009).

3.5.3. PLK1

PLK1 appartient à la famille des PLKs (Polo-Like Kinases) qui comporte également: PLK2, PLK3, PLK4 et PLK5 chez les mammifères. PLK1 est une kinase clé de la mitose. Elle est impliquée dans la maturation des centrosomes, les attachements microtubule-kinétochore, la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse. Le niveau et la localisation de PLK1 sont étroitement régulés au cours du cycle cellulaire. Cette dernière est localisée au cytoplasme et au noyau pendant la phase G2 et s'enrichit dans les centrosomes et les kinétochores pendant la prophase et la métaphase. Une fraction de PLK1 est dégradée pendant l'anaphase après ubiquitination par l'APC/C^{Cdh1}. La fraction restante de PLK1 se concentre dans le fuseau central, puis se localise à l'anneau de "midbody" pendant la cytokinèse. PLK1 contient un domaine kinase N-terminal et un domaine PBD (Polo Box Domain) C-terminal impliqué dans la localisation cellulaire de PLK1 et son interaction avec ses partenaires (Elia, Rellos et al. 2003, van de Weerd, Littler et al. 2008). Au repos, le domaine PBD de PLK1 interagit avec son propre domaine kinase et auto-inhibe son activité. La liaison du PBD à des substrats, portant le motif Ser-pSer/pThr-Pro, stimule l'activité kinase de PLK1 (Elia, Rellos et al. 2003). L'activation de PLK1 se fait également suite à la phosphorylation de son résidu Thr210 de la boucle T activatrice (Archambault and Glover 2009). Par exemple, Aurora A, en coopération avec sa protéine activatrice Bora, phosphoryle PLK1 et l'active pendant l'entrée en mitose (Seki, Coppinger et al. 2008).

Une des cibles de PLK1 pendant l'entrée en mitose est la phosphatase Cdc25. PLK1 phosphoryle Cdc25C et favorise sa localisation nucléaire (Roshak, Capper et al. 2000, Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2002). PLK1 contribue aussi à la boucle de rétroaction positive pour activer CDK1 en phosphorylant et inhibant les kinases Myt1 et Wee1 (Nakajima, Toyoshima-Morimoto et al. 2003, Watanabe, Arai et al. 2004). Outre l'axe Cdc25/Wee1/Myt1, PLK1 peut phosphoryler directement la cycline B induisant sa localisation au noyau pendant

la prophase (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2001). Pendant les premières étapes de la mitose, la phosphorylation de la cohésine par PLK1 et Aurora B résulte en sa dissociation des bras des chromosomes. Cependant, les chromatides sœurs restent liées grâce à la cohésine centromérique et une quantité résiduelle de cohésine au niveau des bras des chromosomes jusqu'au déclenchement de l'anaphase (Sumara, Vorlaufer et al. 2002). PLK1 régule le recrutement du complexe Ndc80-NUF2 à la région externe des kinétochores, favorisant ainsi l'attachement des kinétochores aux microtubules (Wong and Fang 2005). Elle est également nécessaire pour la stabilisation de ces attachements en créant de la tension au niveau du centromère (Sumara, Gimenez-Abian et al. 2004, van Vugt, van de Weerd et al. 2004, Ahonen, Kallio et al. 2005). Le recrutement de PLK1 aux kinétochores implique l'interaction avec plusieurs protéines, dont BUB1 et INCENP (Goto, Kiyono et al. 2006). Au début de la mitose, la phosphorylation de BUB1 et INCENP par CDK1 crée un site de liaison au domaine PBD de PLK1 induisant ainsi sa localisation aux kinétochores. PLK1 pourrait jouer un rôle avec CDK1 dans l'activation d'APC/C^{Cdc20} pour déclencher l'anaphase (Golan, Yudkovsky et al. 2002). Elle régule également la cytokinèse en favorisant l'interaction entre MgcRacGAP et ECT2, ce qui induit l'activation de RhoA et la formation de l'anneau de "midbody" (Burkard, Randall et al. 2007, Petronczki, Glotzer et al. 2007, Santamaria, Neef et al. 2007).

3.6. Le système de contrôle du fuseau mitotique (SAC)

Le système de contrôle du fuseau mitotique, SAC (spindle assembly checkpoint) est un système de surveillance composé de complexes protéiques qui assure la fidélité de la ségrégation chromosomique. Il retarde le déclenchement de l'anaphase en réponse aux kinétochores non ou mal attachés aux microtubules. Quatorze protéines peuvent jouer un rôle dans la signalisation SAC. Parmi elles, on trouve des kinases: BUB1, BUBR1 et MPS1 ainsi que d'autres protéines: BUB3, CENP-E (centromere protein E), MAD1 (mitotic arrest deficient 1) et MAD2 (Musacchio and Salmon 2007) (**Fig 15**). Le SAC s'active par les kinétochores non attachés ou incorrectement attachés. Une tension insuffisante au niveau des centromères peut aussi l'activer. Certaines protéines du SAC séquestrent et inhibent CDC20, la sous-unité activatrice de l'APC/C. Après correction des erreurs d'attachements et

l'établissement de liaisons bi-orientées sur tous les chromosomes, la tension au niveau des centromères augmente jusqu'à satisfaction du SAC et son inactivation. Une fois inactif, le SAC libère CDC20, qui active l'ubiquitine ligase APC/C^{Cdc20}. Cette dernière catalyse l'ubiquitination de la sécurine et de la cycline B qui sont ensuite dégradées par les protéasomes (Musacchio and Salmon 2007). La dégradation de la cycline B résulte en l'inactivation de CDK1 et la dégradation de la sécurine active la séparase qui clive la cohésine centromérique. Ceci permet la séparation des chromatides sœurs et la ségrégation chromosomique marquant ainsi le début de l'anaphase.

BUBR1 et MAD2 peuvent chacun inhiber l'APC/C^{Cdc20} par différents mécanismes *in vitro* (Fang, Yu et al. 1998, Tang, Bharadwaj et al. 2001) et elles collaborent pour inhiber l'APC/C^{Cdc20} *in vivo* en formant le complexe de contrôle mitotique, MCC (mitotic checkpoint complex) composé du complexe BUBR1-BUB3 constitutif, MAD2 et CDC20 (Sudakin, Chan et al. 2001, Chao, Kulkarni et al. 2012). La signalisation SAC commence par la génération du complexe CDC20-MAD2, un processus initié par MAD1, qui est le récepteur de MAD2 aux kinétochores non attachés. Le changement conformationnel de MAD2 entre l'état ouvert (O-MAD2) et fermé (C-MAD2) est central à l'association de MAD2 avec CDC20 (Luo, Tang et al. 2002, Sironi, Mapelli et al. 2002). Dans ce modèle d'activation, MAD1 interagit avec C-MAD2, générant le complexe C-MAD2-MAD1 qui recrute ensuite O-MAD2 à travers l'interface de dimérisation de C-Mad2 et induit la transition conformationnelle de O-MAD2 à C-MAD2. La sous-unité C-MAD2 liée à MAD1 catalyse la liaison de MAD2 recruté à CDC20 (De Antoni, Pearson et al. 2005, Kulukian, Han et al. 2009). Le complexe MAD2-CDC20 s'associe ensuite au complexe BUBR1-BUB3 aux kinétochores pour former le complexe MCC (Sironi, Mapelli et al. 2002). Le MCC bloque le recrutement des substrats de l'APC/C^{Cdc20} de deux façons: **1/** par l'ancrage de CDC20 à un site de liaison sur l'APC/C incompatible pour l'ubiquitination du substrat et **2/** en agissant comme un inhibiteur compétitif du recrutement du substrat via les motifs D-box et KEN-box de BUBR1 qui sont reconnu par CDC20 (Herzog, Primorac et al. 2009, Lara-Gonzalez, Scott et al. 2011, Izawa and Pines 2015) (voir après).

BUB1 est une protéine kinase qui se localise aux kinétochores formés au cours de la prophase et elle est requise pour le recrutement d'autres protéines aux kinétochores. BUB1 joue plusieurs rôles dans la régulation de l'assemblage des kinétochores, la formation du

fuseau mitotique, ainsi que la séparation des chromatides sœurs (Marchetti and Venkatachalam 2010). BUB1 contrôle l'attachement des microtubules aux kinétochores en phosphorylant MAD1 modulant ainsi la disponibilité de MAD2 aux kinétochores (Marchetti and Venkatachalam 2010). CDC20 est également une cible directe de phosphorylation par BUB1 résultant en l'inhibition d'APC/C (Tang, Shu et al. 2004). BUB1 peut servir comme protéine d'échafaudage pour PLK1, qui lui aussi peut phosphoryler CDC20 avec BUB1 et inhiber ainsi l'APC/C (Jia, Li et al. 2016). BUB1 est important pour maintenir les deux chromatides sœurs liées par le centromère jusqu'au début de l'anaphase. En effet, elle phosphoryle le résidu Thr120 de l'histone H2A. Cette phosphorylation est nécessaire pour la localisation centromérique du shugoshin qui forme un complexe avec la phosphatase PP2A. Le complexe shugoshin-PP2A protège la cohésine centromérique pendant la prophase en évitant une phosphorylation excessive et une libération prématurée de la cohésine centromérique (Kawashima, Yamagishi et al. 2010).

MPS1 joue aussi un rôle important dans la signalisation SAC en facilitant le recrutement d'autres protéines SAC aux kinétochores incluant MAD1 et MAD2 (Hewitt, Tighe et al. 2010).

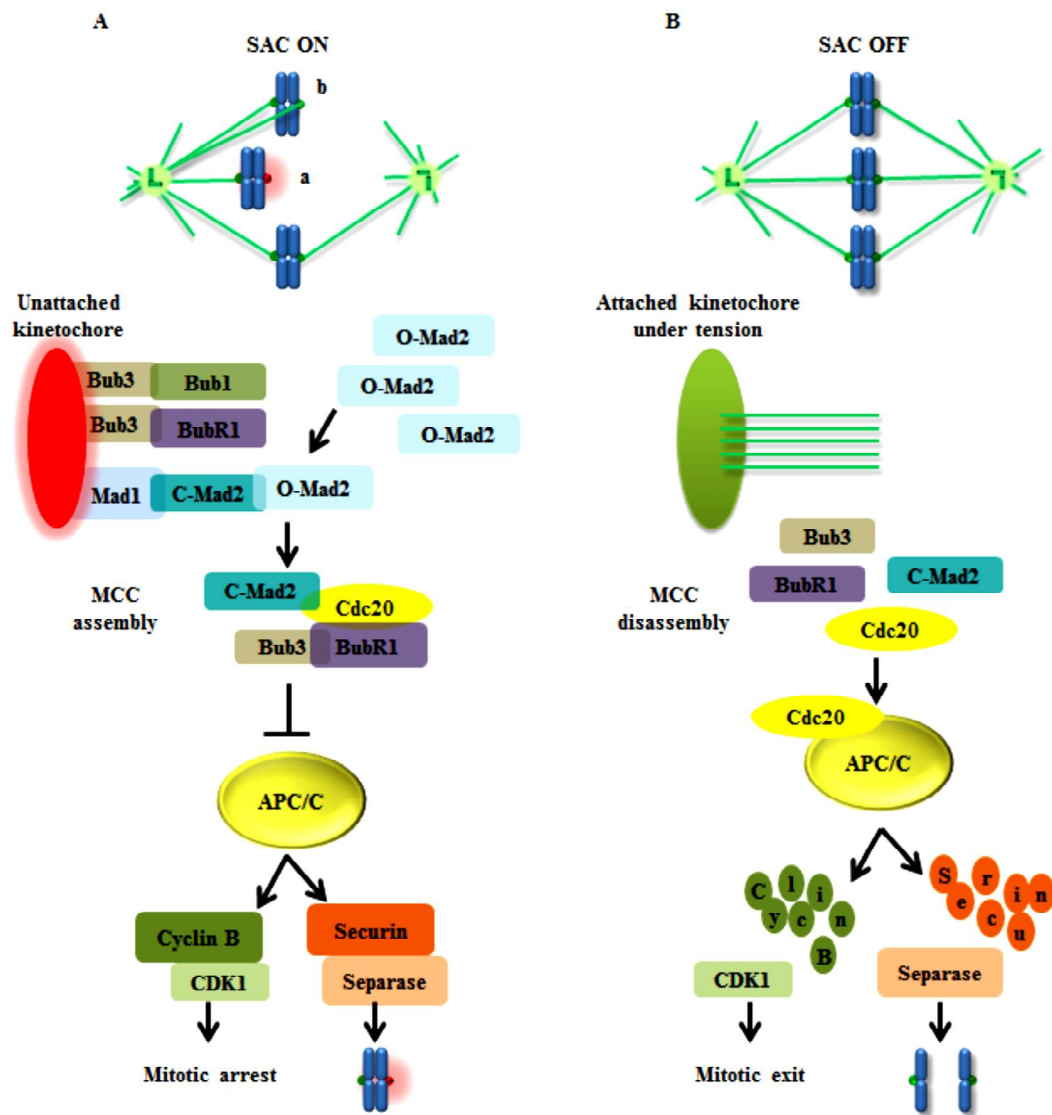


Figure 15. Le système de surveillance du fuseau mitotique (SAC)

A/ Les kinétochores non attachés (a) ou incorrectement attachés (b) activent le SAC (SAC ON): au kinétochore, le complexe Mad1/c-Mad2 recrute o-Mad2 cytosolique et le convertit en c-Mad2. Ce dernier s'associe à Bub3, BubR1 et Cdc20 pour former le complexe MCC qui inhibe l'APC/C, empêchant la dégradation de la sécurine et de la cycline B. **B/** Une fois que tous les kinétochores sont correctement attachés, le SAC est désactivé (SAC OFF). Le complexe MCC se désassemble conduisant à l'activation de l'APC/C. La sécurine est dégradée et la séparase peut dégrader les cohésines qui lient les chromatides sœurs, ce qui déclenche l'anaphase, alors que la dégradation de la cycline B conduit à l'inactivation de la CDK1 et à la sortie mitotique (Marques, Fonseca et al. 2015).

3.7. L'ubiquitination et la mitose

3.7.1. L'ubiquitination

Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle primordial dans le cycle cellulaire. Il permet la dégradation sélective et programmée des cyclines et d'autres protéines permettant une progression orientée et bien synchronisée du cycle cellulaire. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui peut réguler la stabilité, la localisation et la fonction des substrats cibles sans parfois les faire cibler vers la dégradation. L'ubiquitination permet de lier une petite protéine, l'ubiquitine (8 kDa) (mono-ubiquitination) ou plusieurs molécules d'ubiquitine (poly-ubiquitination) au substrat cible par une liaison covalente (généralement sur le résidu Lys11 ou le Lys48 du substrat). Les protéines poly-ubiquitinées sont ciblées vers le complexe protéasome 26S où elles seront dégradées d'une manière dépendante de l'ATP tandis que la mono-ubiquitination modifie la fonction de la protéine mono-ubiquitinée (ou portant une chaîne courte d'ubiquitine) sans la conduire à la dégradation (Behrends and Harper 2011, Komander and Rape 2012). L'ubiquitination comporte des réactions enzymatiques successives. D'abord, la molécule d'ubiquitine se lie à une enzyme activatrice d'ubiquitine (E1) d'une manière dépendante de l'ATP. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée à une enzyme de conjugaison d'ubiquitine (E2) et finalement, cette dernière, en collaboration avec une ubiquitine ligase (E3), lie l'ubiquitine à un résidu Lys spécifique sur la protéine cible. Les ligases E3 sont capables de recruter différents substrats et sont la principale source de spécificité dans le processus d'ubiquitination (Hershko and Ciechanover 1998, Pickart 2001). L'ubiquitination peut également être négativement régulée par des déubiquitinases, qui hydrolysent les liaisons peptidiques ubiquitine-protéine, ce qui permet d'inverser l'ubiquitination des protéines cibles et recycler les molécules d'ubiquitine.

3.7.2. L'ubiquitine ligase APC/C

L'ubiquitination est un processus indispensable à la progression mitotique. L'ubiquitine ligase E3, APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) est le régulateur maître de l'ubiquitination mitotique. Elle appartient à la sous famille des ligases "cullin-RING" (CRL)

faisant partie de la famille des ligases E3 "RING-finger". La sous famille CRL inclut une autre ligase E3 semblable à l'APC/C, la SCF (Skp/cullin/F-box-containing) qui joue un rôle au début de la mitose (Margottin-Goguet, Hsu et al. 2003).

Chez l'homme, le centre catalytique de l'APC/C est un méga complexe composé d'au moins 14 protéines différentes (**Fig 16**), y compris la protéine "RING-finger", Apc11, qui interagit avec une ligase E2 et la sous-unité "cullin-like", Apc2, qui sert de protéine d'échafaudage. L'APC/C peut collaborer avec deux ligases E2, l'UBCH5 et l'UBCH10 (Aristarkhov, Eytan et al. 1996, Yu, King et al. 1996). L'UBE2S est la ligase E2 responsable de l'élongation des chaînes d'ubiquitine sur les substrats d'APC/C, une fois initiée par d'autres ligases E2.

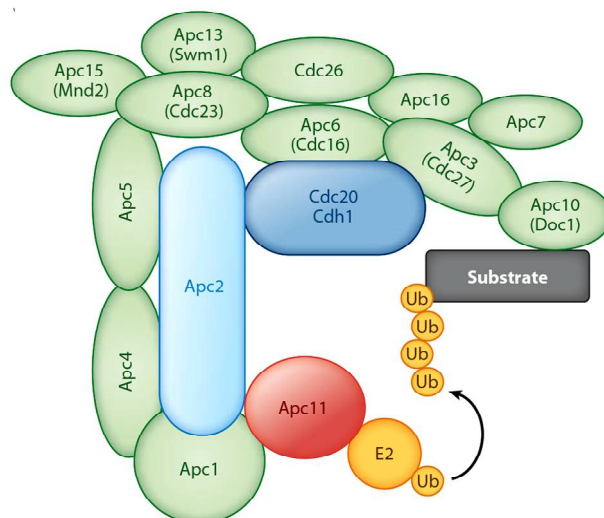


Figure 16. Le complexe APC/C

L'APC/C est composée d'un noyau catalytique, composé d'une protéine de type "culin-like potein", l'Apc2 (bleu clair) qui sert d'échafaudage au complexe, et d'une protéine de type "RING-finger protein", l'Apc11 (pourpre) qui recrute une ubiquitine ligase E2 pour l'ubiquitination du substrat. La liaison et la spécificité du substrat sont fournies par les protéines Cdc20 et Cdh1. L'APC/C est composée d'autres protéines hautement conservées qui donnent un support d'échafaudage moléculaire (vert). Les noms entre parenthèses correspondent aux nomenclatures de ces protéines chez la *Saccharomyces cerevisiae* (Teixeira and Reed 2013).

L'activation de l'APC/C nécessite l'association de l'une de ses deux sous-unités co-activatrices qui servent également à déterminer la sélectivité de l'APC/C vers ses cibles: la protéine CDC20 (Cell Division Cycle protein 20) et la CDH1 (CDC20 homolog 1). Les deux protéines adaptatrices CDC20 et CDH1 possèdent des domaines C-terminaux composés de répétitions WD40, qui reconnaissent les motifs de destruction courts (degrons) sur les substrats cibles. Les motifs de destruction canoniques reconnus par l'APC/C sont le D-box (séquence consensus RXXLXXXXN) et le KEN-box (séquence consensus KENXXXXN) (Glutzer, Murray et al. 1991, Pflieger and Kirschner 2000). CDC20 reconnaît préférentiellement les motifs D-box, tandis que CDH1 reconnaît à la fois les motifs D-box et KEN-box. La protéine Apc10 de l'APC/C contribue également à la reconnaissance du D-box du substrat cible (Carroll, Enquist-Newman et al. 2005, da Fonseca, Kong et al. 2011). L'APC/C des vertébrés lie préférentiellement les chaînes d'ubiquitine aux résidus Lys11 des substrats (Jin, Williamson et al. 2008). La régulation de l'activité d'APC/C et sa sélectivité de substrat sont contrôlées non seulement par l'association aux protéines adaptatrices CDC20 et CDH1, mais aussi par la liaison d'inhibiteurs d'APC/C tels que Emi1 (early mitosis inhibitor1) (Peters 2006) ou la phosphorylation de son core catalytique (Kraft, Herzog et al. 2003). De plus, des motifs d'initiation sur les substrats d'APC/C, différents des motifs D-box et KEN-box, déterminent l'efficacité de l'initiation de la chaîne d'ubiquitine, précisant ainsi l'ordre dans lequel divers substrats sont dégradés pendant la mitose (Williamson, Banerjee et al. 2011).

L'APC/C^{Cdc20} est principalement responsable de la séparation des chromatides sœurs pendant l'anaphase et de l'initiation de la sortie de la mitose en déclenchant le signal de dégradation des cyclines A et B et de la sécurine (Yu 2007). Bien que la protéine CDC20 commence à s'accumuler en phase S, l'APC/C^{Cdc20} ne s'active qu'au moment de la transition métaphase-anaphase (Fang, Yu et al. 1998, Prinz, Hwang et al. 1998). L'inhibition de l'APC/C^{Cdc20} pendant cet intervalle permet l'accumulation de cyclines mitotiques pour une activation maximale de CDK1. Pendant les phases S et G2, l'APC/C^{Cdc20} est inhibée par Emi1, qui lie la CDC20 et empêche le recrutement des substrats de l'APC/C^{Cdc20} (Reimann, Freed et al. 2001, Reimann, Gardner et al. 2001). Au début de la mitose, Emi1 est phosphorylé par PLK1 et CDK1-cycline B ce qui induit son ubiquitination par SCF ^{β -Trep} (une ligase E3) puis sa dégradation (Margottin-Goguet, Hsu et al. 2003, Hansen, Loktev et al. 2004). Le SAC prend

ensuite le relai pour inhiber APC/C^{Cdc20} pendant les premières phases de la mitose. Après satisfaction du SAC (tous les chromosomes à la plaque de métaphase sont correctement attachés de façon bipolaire au fuseau mitotique), l'APC/C^{Cdc20} est directement phosphorylée et activée par CDK1-cycline B, permettant ainsi l'ubiquitination et la dégradation de la cycline B dans une boucle de rétroaction négative (Rudner and Murray 2000, Kraft, Herzog et al. 2003). L'ubiquitination de la sécurine par l'APC/C^{Cdc20} conduit à sa dégradation rapide par les protéasomes et l'activation de la séparase (une cystéine protéase), qui clive ensuite la sous-unité Scc1 de la cohésine centromérique, permettant la séparation des chromatides sœurs (Uhlmann, Lottspeich et al. 1999, Waizenegger, Hauf et al. 2000). Après le début de l'anaphase, l'APC/C^{Cdc20} est inactivée par plusieurs mécanismes, y compris la régulation négative de l'expression de CDC20 et sa dégradation par l'APC/C^{Cdh1} (Prinz, Hwang et al. 1998). Cette dernière prend le relai pour finaliser la sortie de la mitose et la progression vers la phase G1 subséquente en maintenant des niveaux faibles de protéines mitotiques (Qiao, Zhang et al. 2010, Wasch, Robbins et al. 2010). Au cours des phases S et G2 et au début de la mitose, CDH1 est phosphorylée par les CDKs empêchant son association avec le core catalytique de l'APC/C (Zachariae, Schwab et al. 1998, Jaspersen, Charles et al. 1999). Contrairement à l'APC/C^{Cdc20}, l'APC/C^{Cdh1} s'active à des faibles niveaux d'activité du complexe CDK1-cycline B permettant de continuer la dégradation des cyclines mitotiques après le début de l'anaphase. Elle favorise aussi l'ubiquitination puis la dégradation des kinases mitotiques telles que Aurora A (Taguchi, Honda et al. 2002), Aurora B (Stewart and Fang 2005) et la PLK1 (Lindon and Pines 2004). La dégradation des cyclines mitotiques par l'APC/C^{Cdc20} et l'inactivation concomitante de CDK1 sont donc les principaux activateurs de l'APC/C^{Cdh1}. D'autres substrats sont aussi dégradés par l'APC/C^{Cdh1} pendant la sortie mitotique tels que les kinésines CENP-E et Kid (Brown, Coulson et al. 1994, Feine, Zur et al. 2007), impliqués dans la dynamique des microtubules et la formation du fuseau mitotique ainsi que certains facteurs associés au fuseau, SAFs (spindle associated factors) (Song and Rape 2010).

3.7.2. L'ubiquitination comme code de signalisation mitotique

L'ubiquitination des substrats peut modifier leurs fonctions et servir comme code de signalisation sans induire leur dégradation. Le code "ubiquitine" est aussi important que le système ubiquitine-protéasome dans la mitose. En effet, pendant l'interphase, l'ubiquitination de l'histone H2A par l'ubiquitine ligase RING1B empêche Aurora B de se lier à la chromatine (de Napoles, Mermoud et al. 2004). Au cours de la transition G2/M, une déubiquitinase de l'histone H2A, USP16, est recrutée aux nucléosomes pour enlever l'ubiquitine de l'histone H2A, permettant ainsi le recrutement d'Aurora B, la phosphorylation de l'histone H3 et la condensation des chromosomes (Joo, Zhai et al. 2007).

De plus, l'ubiquitination de PLK1 peut réguler sa localisation pendant la mitose indépendamment de son niveau protéique. En effet, l'ubiquitine ligase E3, CUL3 liant la protéine adaptatrice KLHL22 (CUL3-KLHL22) catalyse l'ubiquitination du résidu Lys492 situé dans le domaine PBD du PLK1 entraînant sa dissociation des kinétochores, la satisfaction du SAC et la progression mitotique (Beck, Maerki et al. 2013). Aurora B est également une cible mitotique de la ligase CUL3 qui régule sa dynamique pendant la mitose sans affecter sa stabilité. L'ubiquitination d'Aurora B par CUL3-KLHL9/KLHL13 est nécessaire pour sa dissociation des centromères (Sumara, Quadroni et al. 2007) et son ubiquitination par CUL3-KLHL21 est impliquée dans sa localisation au niveau du fuseau central au début de l'anaphase (Maerki, Olma et al. 2009). La protéine récepteur de l'ubiquitine, UBASH3B, semble jouer un rôle important dans le recrutement d'Aurora B ubiquitinée au niveau des microtubules du fuseau central (Krupina, Kleiss et al. 2016). En régulant la localisation de PLK1 et Aurora B, l'ubiquitine ligase CUL3 joue un rôle différent de celui de l'ubiquitine ligase APC/C qui régule plutôt les niveaux des protéines mitotiques.

4. Hypothèse et objectifs

La GTPase ARF6 a été identifiée comme étant un médiateur important de la migration cellulaire (Santy and Casanova 2001, Charles, Namkung et al. 2016) et l'invasion tumorale (Hashimoto, Onodera et al. 2004, Tague, Muralidharan et al. 2004). Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse qu'ARF6 contrôle la prolifération cellulaire.

D'abord, dans un contexte cardiovasculaire, nous avons vérifié le rôle d'ARF6 dans la prolifération des CMLVs induite par l'AngII (**chapitre 1**). Plusieurs études ont précédemment montré un lien entre ARF6 et Rac1 dans différents modèles cellulaires (D'Souza-Schorey, Boshans et al. 1997, Santy and Casanova 2001, Albertinazzi, Za et al. 2003, Palacios and D'Souza-Schorey 2003). De plus, Rac1 est un médiateur de la production des ROS dans les CMLVs (Hordijk 2006). Par conséquent, notre hypothèse était qu'ARF6 pourrait contrôler la production des ROS via Rac1 et que les ROS pourraient ensuite agir comme intermédiaires pour activer les MAP Kinases et induire la prolifération cellulaire.

Deuxièmement, nous avons étudié le rôle d'ARF6 dans la progression du cycle cellulaire et nous avons découvert un rôle essentiel d'ARF6 dans la mitose (**chapitre 2**). Notre but était ensuite de déterminer les mécanismes par lesquels cette GTPase contrôle la progression mitotique.

Finalement, notre dernière hypothèse était qu'ARF6 pourrait promouvoir la prolifération cellulaire via la voie mTOR étant donné le rôle important de cette dernière dans la progression du cycle cellulaire (Fingar, Richardson et al. 2004). Nous avons donc étudié l'effet de la déplétion d'ARF6 sur les différentes composantes en aval de mTOR (**chapitre 2**).

Chapitre 1. The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

Article publié dans le journal Plos one

Mohamed Bourmoum¹, Ricardo Charles¹, Audrey Claing^{1*}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

*Corresponding author

E-mail : audrey.claing@umontreal.ca (AC)

1.1. Abstract

High reactive oxygen species (ROS) levels and enhanced vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation are observed in numerous cardiovascular diseases. The mechanisms by which hormones such as angiotensin II (Ang II) act to promote these cellular responses remain poorly understood. We have previously shown that the ADP-ribosylation factor 6 (ARF6), a molecular switch that coordinates intracellular signaling events, can be activated by the Ang II receptor (AT1R). Whether this small GTP-binding protein controls the signaling events leading to ROS production and therefore Ang II-dependent VSMC proliferation, remains however unknown. Here, we demonstrate that in rat aortic VSMC, Ang II stimulation led to the subsequent activation of ARF6 and Rac1, a key regulator of NADPH oxidase activity. Using RNA interference, we showed that ARF6 is essential for ROS generation since in conditions where this GTPase was knocked down, Ang II could no longer promote superoxide anion production. In addition to regulating Rac1 activity, ARF6 also controlled expression of the NADPH oxidase 1 (Nox 1) as well as the ability of the EGFR to become transactivated. Finally, ARF6 also controlled MAPK (Erk1/2, p38 and Jnk) activation, a key pathway of VSMC proliferation. Altogether, our findings demonstrate that Ang II promotes activation of ARF6 to control ROS production by regulating Rac1 activation and Nox1 expression. In turn, increased ROS acts to activate the MAPK pathway. These signaling events represent a new molecular mechanism by which Ang II can promote proliferation of VSMC.

Keywords: ROS, ARF, Angiotensin, proliferation, vascular smooth muscle cells.

1.2. Introduction

Vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation is a crucial event during normal vascular development. However, this cellular process plays a major role in cardiovascular diseases such as atherosclerosis, restenosis after angioplasty and hypertension [1-3]. Among all hormones and growth factors, angiotensin II (Ang II) signaling pathways have been widely studied in this context [4-6]. Most of the physiological and pathophysiological actions of this

8-amino acid peptide are mediated by the activation of its best-characterized receptor: the angiotensin II type 1 receptor (AT1R). This membrane protein, which couples to heterotrimeric G protein complexes, promotes the activation of classical downstream effectors including phospholipase C (PLC), phospholipase A2 (PLA2), and phospholipase D (PLD) [7, 8]. AT1R activation can also mediate signaling via β arrestin recruitment or transactivation of tyrosine kinase receptors (RTK). These often lead to the activation of mitogenic signaling (Erk, p38, Jnk) [9].

Reactive oxygen species (ROS) have also been shown to function as important signaling molecules in promoting VSMC proliferation [10, 11]. ROS can be generated by a number of pathways including NADPH oxidase (Nox) enzymes. Aortic VSMC express Nox1 and Nox4 in rodents as well as Nox5 in humans [12] and Ang II stimulation has been reported to increase intracellular levels of ROS although the mechanism by which it does has yet to be fully elucidated. Previous studies have reported that enzymes such as PLD, PKC, Src and PI3K β may play a role [13, 14]. Interestingly, activation of Rac1, a small GTP-binding protein of the Rho family, in addition to its recruitment to Nox1, are crucial events for superoxide anion production following Ang II stimulation of VSMC [15]. Furthermore, transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) was reported to involve activation of the metalloprotease ADAM17, shedding of HB-EGF and ROS production [16]. Finally, it was suggested that activation of MAPK was sensitive to ROS. For example, Jnk and p38 activation, in response to Ang II, can be blocked by several antioxidants [17, 18], while the sensitivity of Erk1/2 remains controversial [18-21].

Our previous work has brought attention to another family of small GTP-binding proteins as key molecular switches activated by the AT1R: the ADP-ribosylation factors (ARF). These were initially characterized as key molecules regulating vesicle trafficking [22, 23]. Six members of this Ras-related family of proteins have been identified. The two best-characterized isoforms are ARF1 and ARF6. In HEK 293 cells stably expressing the AT1R, we reported that Ang II stimulation results in the activation of ARF6, an isoform associated with the plasma membrane. This GTPase is known to regulate receptor endocytosis and actin remodeling [24]. In addition, ARF6 activation, by this receptor, controls activation of Rac1, another GTPase. Like all GTP-binding proteins, ARF6 cycles between its inactive (GDP-

bound) and active (GTP-bound) form. This cycling is controlled by guanine nucleotide exchange factors (GEF) and GTPase-activating proteins (GAP). ARF6 has been associated with proliferation in many cell lines; overexpression of the dominant negative mutant ARF6T27N was effective in reducing VEGF-induced proliferation of endothelial cells [25]. Numerous studies suggest that ARF6 is implicated in the proliferation of cancer cells [26, 27]. Furthermore, cross talk between ARF6 and Rac1 was demonstrated in many cellular functions. First, ARF6 mediates peripheral actin rearrangement through Arfaptin2, a Rac1-interacting protein [28]. Coordinated action of ARF6 and Rac1 was also reported in neurite outgrowth and epithelial cell scattering [29-31] and we showed that ARF6 can interact with Rac1 upon Ang II stimulation to regulate membrane ruffling and cellular migration [24].

Because of the increasing interest in understanding the role of ROS in cardiovascular diseases, we aimed here at examining whether ARF6 could regulate ROS production and ultimately proliferation of VSMC. Our findings demonstrate that besides its traditional role in endocytosis and actin remodelling, ARF6 is a pivotal player in Ang II signaling. We show for the first time that this GTPase regulates ROS generation by controlling Rac1 activation and Nox1 expression. The ability of ARF6 to control Rac activity directly impacts the ability of this GTPase to control, in turn, the function of Nox1, the main ROS generating enzyme in our cells. In addition, by acting at the level of Nox1 gene expression, ARF6 can directly impact ROS production. Through ROS, ARF6 also regulates EGFR transactivation and MAPK activation. Activation of these key signaling events are important for cellular responses such as proliferation. In this study, we show that depletion of ARF6, expression of a Rac1 dominant negative mutant or treatment of the cells with EGFR as well as ROS inhibitors greatly impairs the ability of Ang II to promote VSMC proliferation. Altogether, our findings demonstrate that the GTPase ARF6 acts as a molecular switch to activate Ang II-mediated signaling pathways leading to ROS production and MAPK activation, to regulate VSMC proliferation.

1.3. Materials and Methods

1.3.1. Reagents

Lipofectamine 2000TM was purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Ang II, Dihydroethidium (DHE), diphenyliodonium (DPI), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, cytochrome C, ML171 and AG1478 were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Antibodies against ARF6, HA-tag, Erk1/2, Noxa1 and Nox1 were from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Rac1 and Myc-tag monoclonal antibodies were from Millipore Corporation (Mississauga, ON, Canada). Antibodies against actin, phospho-Erk1/2, p38, phospho-p38, Jnk, phospho-Jnk, EGFR, phospho-Tyr1086 EGFR and phosphoTyr845 EGFR were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Anti-Nox1 was from Bioss Antibodies (Woburn, MA, USA). Anti-Nox4 was from Abcam (Toronto, ON, Canada). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated antibodies were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). ARF6 and Rac1 shRNA were obtained as lentiviral plasmids (pLKO.1-puro) provided as bacterial glycerol stocks by Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Lentiviruses were then produced in HEK293T cells using an adapted protocol from Laurie Ailles/Weissman Lab (Mississauga, Ontario, Canada) and Clontech protocols (Clontech Laboratories, Inc). Sequences of shARF6 and shRac1 are found in MISSION[®] shRNA Library, Sigma Aldrich (ARF6 shRNA, Clone ID: NM_001663.3-926s21c1, sequence: ACCGGAGCTGCACCGCATTATCAATGCTCGAGCATTGATAATG CGGTGCAGCTTTTTTTTG. Rac1 shRNA, Clone ID: NM_009007.2-544 s21c1, Sequence: CCGGGCTTGATCTTAGGGATGATAACTCGAGTTATCATCCCTAAGATCAAGCTTTT TG.

1.3.2. Cell culture, transfection and lentiviral transduction

All experiments were carried out using rat aortic VSMC clone SV40LT-SMC purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (Wisent, QC, Canada) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. For ARF6 and

Rac1 constructs overexpression, we transfected cells using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected with the empty or the ARF6/Rac1 DNA clones encoding vectors for 24h before being used for experiments. In ARF6 and Rac1 knock down experiments, we infected cells with the scrambled or the specific shRNA lentiviruses and media was changed after 8h. After 72h of lentiviruses infection, the targeted proteins were 100% depleted. Before all experiments, cells were serum starved for 48h (0.2% FBS).

1.3.3. Western blotting

Cells were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 140 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi and 1mM orthovanadate, pH 7.4) complemented with protease inhibitors aprotinin (5µg/ml), benzamidine (150 µg/ml), leupeptin (5 µg/ml), pepstatin (4 µg/ml) and phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM). Cell lysates were solubilized at 4°C for 30 min and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific antibodies. Secondary antibodies were all horseradish peroxidase-conjugated. Protein expression was detected by chemiluminescence (ECLTM Prime, GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada). The digital images obtained were quantified using ImageJ software.

1.3.4. GTPases activation assays

Activation levels of ARF6 and Rac1 were assessed using GST-pull down assays using GST-GGA3 and GST-PAK(CRIB) coupled to glutathione-sepharose 4B beads, respectively, as in [24]. ARF6-GTP and Rac1-GTP levels were detected by Western blot analysis.

1.3.5. ROS measurement

DHE was used to evaluate superoxide anion levels. VSMC were seeded onto coverslips, left overnight, and serum starved for 48h (0.2% FBS). After Ang II stimulation (100 nM) for the indicated times, cells were washed twice with PBS and incubated with DHE (5 μ M in HBSS) at 37°C for 15 min, in the dark. Cells were then washed, mounted onto slides, and observed by fluorescence microscopy (Zeiss, Germany) (excitation 535 λ , emission 595 λ). Images were taken and fluorescence quantification was performed using ImageJ software (3 to 4 images per slide representative of 1000-1500 cells per condition). For the cytochrome C reduction assay, seeded cells were serum starved for 48h (0.2% FBS) and stimulated or not with Ang II (100 nM, 60 min). The medium was then replaced by a buffer (145 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.7 mM NaH₂PO₄, 0.54 mM CaCl₂, 1.22 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 0.1 mM deferoxamine mesylate) containing 50 μ M of acetylated cytochrome C and 1U/ μ l of catalase (to prevent re-oxidation of reduced cytochrome C by H₂O₂). Identical samples are incubated in the presence of 1U/ μ l of superoxide dismutase (SOD). Cells were then incubated at 37°C for 1h, in the dark. 200 μ l post-incubation supernatants were transferred to a 96-well plate and absorbance (OD) was assessed at 540, 550 and 560 nm. Absorbance (optical density) of reduced cytochrome C was calculated using the formula: $OD_{550nm} - ((OD_{540nm} + OD_{560nm})/2)$. ODs from identical samples containing SOD were subtracted and only the SOD inhibitable value was considered.

1.3.6. RNA extraction and quantification

Seeded control and ARF6-depleted VSMC (day 3 of lentiviruses infection) were serum starved for 48h (0.2% FBS). Total RNA was extracted from cells with TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The specific mRNA quantification using RT-qPCR was performed by the genomic platform at the IRIC (Genomics Core Facility, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada).

1.3.7. Cell counting, cell viability and MTT assays

Equal number (4×10^5) of VSMC infected with scrambled or ARF6 shRNA lentiviruses (day 3 of infection) were reseeded and serum starved for 48h (0.5%FBS). Cells were then stimulated or not with Ang II (100 nM) for 24, 48 or 72h. For each indicated time point, cells were stained using trypan blue, and live cells were manually counted using a hemocytometer. Cell proliferation was also measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. VSMC were cultured in 96-well plates (3×10^3 cells/well), serum starved for 48h (0.5% FBS) and then stimulated or not with Ang II (100 nM). After 3 days, 25 μ l of MTT (5 mg/ml) was added to the culture medium and cells were incubated for an additional 2h at 37°C before being solubilized in 20% SDS/ 50% dimethylformamide solution overnight. Absorbance was measured at 570 nm with a reference wavelength at 450 nm using the microplate reader (Wallac Victor; Perkin Elmer, MA, USA). For ARF6 knock down experiments, VSMC were seeded in the 96-well plates at the third day of infection with scrambled or ARF6 shRNA lentiviruses. DMSO vehicle, DPI, AG1478 or ML171 was added to medium 8h before Ang II stimulation. For Rac1T17N overexpression experiments, cells were cultured in 96-well plate 24h after plasmid transfection.

1.3.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using t test, one-way or two-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test using GraphPad Prism (version 5, San Diego, CA, USA).

1.4. Results

1.4.1. ARF6 controls Ang II-induced Rac1 activation

First, we examined whether Ang II stimulation could promote the activation of ARF6 in rat aortic VSMC, a cellular model expressing endogenously the AT1R. As illustrated in Fig 1A, Ang II (100 nM) rapidly induced GTP-loading of ARF6 where maximal levels were observed within 2 min of stimulation (~ 3.1 fold). High levels of the activated GTPase remained sustained for 15 min, but slowly decreased afterwards (~1.7 fold; after 30 min). In addition, Ang II treatment of the cells also resulted in the activation of Rac1 (Fig 1B). Interestingly, the time-course of activation of the two small GTP-binding proteins was different. Maximal Rac1-GTP levels occurred after 5 min (~2.5-fold), slightly decreased after 15 min, but remained sustained for 30 min (~2.1 fold). The rapid GTP-loading of ARF6 suggests that activation of this GTPase might be an upstream event regulating Rac1 activation. We therefore next examined whether depleting endogenously expressed ARF6, in VSMC, could alter the ability of Ang II to promote GTP-loading of Rac1. As shown in Fig 1C, depletion of ARF6 had no effect on the basal level of activated Rac1, but completely abolished Ang II-mediated Rac1 activation after 5 min of stimulation. These results therefore suggest that Ang II-induced Rac1 activation is a process that is dependent upon the GTPase ARF6.

1.4.2. Ang II-induced superoxide anion production is ARF6-dependent

It was previously reported that Ang II-induced superoxide anion production is dependent upon the activation of Rac1[15]. We therefore hypothesized that ARF6 may play a key role in controlling ROS production when VSMC are stimulated by Ang II. Here, we measured levels of superoxide anion using dihydroethidium (DHE) staining. In control VSMC, agonist-treatment significantly increased superoxide anion production in a biphasic fashion with two peaks: the first one after 5 min of stimulation (~1.7 fold) and the second one, after 1h (~1.68 fold) (Fig 2A, B). When cells were depleted of ARF6, we observed a significant decrease (~48 %) in the basal level of superoxide anion present in VSMC, and

interestingly ARF6 knock down totally prevented Ang II-induced increase of superoxide anion production (Fig 2A, B). To confirm these data, we used the cytochrome C assay as an alternative approach to measure ROS production [32]. As illustrated in Fig 2C, Ang II treatment significantly increased ROS levels. This effect was markedly impaired when cells were depleted of ARF6.

We next confirmed the role of Rac1 activation in Ang II-induced ROS production in our cells by overexpressing an empty vector (cnt) or the myc-tagged dominant negative Rac1T17N (myc-Rac1T17N) mutant. Myc-Rac1T17N overexpression did not affect the basal level of superoxide anions, but significantly reduced Ang II-promoted ROS increase after 5 min of stimulation (Fig 2D, 2E). Western blot assays were carried out in parallel to confirm expression of the Rac1 dominant negative mutant. These findings indicate that ARF6 plays a role in maintaining basal ROS level in VSMC and demonstrate that Ang II-induced superoxide anion production is dependent upon the subsequent activation of ARF6 and Rac1.

1.4.3. ARF6 regulates Nox1 expression

Since depletion of ARF6 reduced the basal level of superoxide anions without affecting the basal Rac1 activation, we asked whether this ARF protein could control ROS levels by another mechanism, independent of Rac1. We therefore next sought to examine the role this ARF isoform may play on the expression of the major ROS generating enzymes, the NADPH oxidases. We first examined the expression profile of Nox isoforms in our cells. In VSMC, Nox1 and Nox4 were highly expressed (Fig 3A), while Nox2 was barely detectable (data not shown). Next, we evaluated protein and mRNA levels of Nox1 and Nox4 in control and ARF6-depleted VSMC, maintained in a quiescent state to avoid any exogenous regulation of Nox expression. As illustrated in Fig 3A, ARF6 depletion resulted in a ~ 50% decrease in Nox1 protein level and a ~ 68% decrease in mRNA level (Fig 3B). In contrast, knock down of the GTPase did not significantly affect Nox4 protein and mRNA levels. Similarly, expression of the regulatory subunits Noxa1 and Noxo1 remained unaffected in ARF6-depleted cells (Fig 3C).

To further understand how ARF6 could regulate expression of this ROS-generating enzyme, we first examined the role of Rac1. When endogenous expression of this Rac isoform was inhibited, expression of Nox1 remained the same in VSMC (Fig 3D) suggesting that Rac1 is not an intermediate in the regulation of the expression of this key enzyme. To further investigate the role of ARF6 and Rac1, we used a different strategy and overexpressed either the active or inactive mutant form of this small G protein. As illustrated in Fig 3E, expression of either wild type (WT), the fast cycling ARF6 mutant (ARF6T157A), or the dominant negative (ARF6T27N) form, remained ineffective in modulating Nox1 expression. Similarly, expression of Rac1, the constitutively active (Rac1Q61L), or the dominant negative (Rac1T17N) mutants had no effect on Nox1 expression (Fig 3E).

Together, these results demonstrate that the expression of ARF6 is essential for maintaining Nox1 expression levels in VSMC. This mechanism is independent of its activation state or of its ability to signal through Rac1.

1.4.4. ARF6 mediates the ROS-dependent EGFR transactivation

To further define the molecular mechanisms by which ARF6 may regulate Ang II-mediated function in VSMC, we examined the involvement of the EGFR. Previous reports have demonstrated that ROS acts as a signaling molecule to induce EGFR transactivation [16]. We therefore next assessed Ang II-mediated EGFR transactivation in control (scrambled shRNA) and ARF6-depleted (ARF6 shRNA) cells by assessing the phosphorylation state of two different tyrosine sites on the EGFR intracellular domain, Tyr1086 and Tyr845. As shown in Figs 4A and B, Ang II similarly increased the phosphorylation of both tyrosine residues in control cells. EGFR activation reached its maximum at 5 min (~1.9 fold for Tyr1086 and ~2.6 fold for Tyr845) and was sustained for 30 min. In contrast, ARF6 depleted cells showed a decrease in basal EGFR activation (~ 37% less for Tyr1086 and ~60% less for Tyr845) and Ang II-induced phosphorylation of Tyr1086/Tyr845 was suppressed suggesting that ARF6 is required for transactivation of this RTK by the AT1R. When cells expressed the dominant negative mutant of Rac1, phosphorylation of the EGFR was also reduced (Fig 4C). To further investigate the role of ROS in this process, we examined Ang II-induced EGFR transactivation

in control cells (DMSO) and cells treated with diphenyliodonium (DPI 10 μ M), a broad spectrum flavoprotein inhibitor. Interestingly, we found that blocking Nox enzymes by DPI completely inhibited the Ang II-mediated phosphorylation of Tyr1086 and Tyr845 on the EGFR (Fig 4D). The role of Nox1 was confirmed when we treated cells with ML171 (Fig 4E).

1.4.5. ARF6 is required for the activation of ROS sensitive MAPK and proliferation

To further define the role of the AT1R/ARF6/Rac1/ROS/EGFR signaling axis, we examined activation of mitogenic signaling cascades. We first assessed the phosphorylation state of Erk1/2, p38 and Jnk. In control cells, Ang II increased the activation of all three MAPK. Time-course profiles were similar with a peak after 5 min of Ang II treatment (\sim 1.8 fold for Erk1/2, \sim 2.4 fold for p38 and \sim 1.6 fold for Jnk) (Fig 5A). However, depletion of ARF6 markedly blocked the Ang II-induced phosphorylation of Erk1/2, p38 and Jnk (Fig 5A). As previous studies have reported that ROS is a key regulator of MAPK activation [17, 18, 20], we next confirmed their role in our cells. VSMC were treated with either a vehicle or the NADPH oxidase inhibitor, DPI, for 30 min and subsequently stimulated with Ang II. As illustrated in Fig 5B, inhibition of ROS production completely prevented activation of the three MAPK upon Ang II stimulation. Specific inhibition of EGFR phosphorylation with AG1478 or Nox1 with ML171 resulted in the same effect (Fig 5C). These findings and the results above further support our hypothesis that ARF6 controls ROS production to mediate Ang II-promoted MAPK activation in VSMC.

We next examined a key Ang II-mediated cellular response, proliferation. As illustrated in Fig 6A, depletion of ARF6 markedly impaired the ability of VSMC to proliferate upon Ang II treatment. After 3 days of agonist stimulation, cell number was enhanced by \sim 4.9-fold in the control, and \sim 1.7-fold in the ARF6-depleted conditions (Fig 6A). Similar results were obtained when we used an alternative approach to assess cell growth, the MTT assay (Fig 6B). As illustrated in Fig 6C, expression of the dominant negative Rac1T27N mutant effectively reduced Ang II-mediated VSMC proliferation (43%). To confirm that this

cellular response was indeed dependent upon ROS generation, we tested the effect of DPI and ML171. Interestingly, Ang II-induced VSMC proliferation was markedly inhibited when cells were incubated with these inhibitors (Fig 6D). Blockade of EGFR activation by AG1478 also markedly reduced proliferation (Fig 6D). Next, we performed cell viability assays to verify whether the reduced proliferation that we observed in ARF6-depleted cells could be a result of increased cell death. We found that neither ARF6 knock down nor Nox enzyme blocking affected cell viability (Fig 6E). Altogether, our findings show that ARF6 acts through ROS to promote Ang II-dependent VSMC proliferation.

1.5. Discussion

Our findings provide evidence of a completely new role for ARF6, classically known as a regulator of endocytic membrane trafficking, actin remodelling and phospholipid metabolism [22]. Here, we demonstrate that this GTPase is a key regulator of Ang II-induced ROS production by a molecular mechanism involving the regulation of Rac1 activation as well as Nox1 protein expression. Once ROS levels are enhanced in cells, these signaling intermediates regulate MAPK activation through transactivation of the EGFR and ultimately VSMC proliferation.

Previous studies have shown a coordinated action between ARF6 and Rac1 in different cellular models [28-31]. We have previously demonstrated that the two GTPases can directly associate upon Ang II stimulation [24]. Here, we report that Ang II activates both endogenous ARF6 and Rac1 in VSMC. Interestingly, we observed that ARF6 activation occurred earlier than Rac1 suggesting that GTP-loading of these two GTPases may be sequential. This hypothesis was confirmed by the loss of Ang II-induced Rac1 activation when ARF6 was depleted. Different possible molecular mechanisms have been proposed for ARF6-mediated activation of Rac1. Santy and colleagues reported that this ARF isoform modulated Rac1 activity through the regulation of the Dock180/Elmo complex in MDCK cells [33]. Furthermore, ARF6 was also shown to promote Rac1 activation by controlling the recruitment of a protein complex containing the ARFGAP GIT1/2 and the RacGEF β -PIX [34, 35]. Interestingly, it was proposed that ARF6 could regulate membrane targeting of Rac1

necessary for its activation through transformation of lipid rafts [36]. Whether, in VSMC, ARF6 regulates the function of a RacGEF remains to be determined.

The role of Rac1 has been extensively studied in the context of ROS production. This GTP-binding protein was defined as an essential component of Nox1, Nox2 and Nox3 complexes [15]. In addition to controlling the Ang II-mediated activation of Rac1, we observed that ARF6 knock down resulted in a substantial decrease of basal levels of superoxide anions. We demonstrate that this is due to a direct effect of the GTPase on Nox1 expression specifically, although aortic rodent VSMC expresses both Nox1 and Nox4. Our results suggest that the presence of ARF6, rather than its activation state, controls Nox1 expression. Interestingly, it was previously reported that expression of this Nox isoform was under the control of the transcription factors GATA-4,-5 and -6 in colon epithelial cells [37]. In VSMC, GATA-6 has been shown to be a key regulator of gene expression [38]. Whether ARF6 regulates Nox1 expression through this specific transcription factor needs to be further investigated.

EGFR transactivation plays an important role in Ang II signaling. In VSMC, this process was shown to require activation of metalloprotease 2/9 and Src [39]. Our findings further demonstrate that Ang II-mediated transactivation of the EGFR requires ARF6 since knock down of this GTPase can prevent phosphorylation of Tyr1086 and Tyr845 on the EGFR. Interestingly, the later residue is a target of Src, whose activation was reported to be sensitive to ROS [40]. We demonstrate here that pre-treatment of cells with the specific Nox inhibitor, ML171, prevented Ang II-induced EGFR transactivation. Mifune and colleagues have reported that ROS production occurs upstream of EGFR transactivation upon Ang II stimulation [16]. In contrast, others proposed that EGFR transactivation occurred upstream and was required for ROS production [13]. In our cell model, we suggest that ARF6-mediated ROS production is required for EGFR transactivation. These data do not however exclude the possibility that transactivation of EGFR may lead to an additional production of ROS. Furthermore, we found that Ang II-induced activation of the MAPK Erk1/2, p38 and Jnk was completely suppressed in ARF6-depleted cells. These signaling events were also dependent on ROS production since the activation of all of these three MAPK was blocked by inhibiting Nox enzymes confirming their redox sensitivity. Although the sensitivity of p38 and Jnk to

ROS has been previously reported [17, 18, 41, 42], the sensitivity of Erk1/2 to ROS remains controversial [18-21, 42]. Our results support the observation that ARF6-dependent ROS generation is a key step for Ang II-dependent MAPK activation. Because MAPK are important for cellular proliferation, we therefore expected that ARF6 would play a crucial role in this biological response. Our results indicate that this GTPase indeed controls basal as well as Ang II-dependent VSMC proliferation. This first observation may be explained by the low level of ROS found in ARF6-depleted cells. Although ARF6 knock down completely abolished superoxide anion production as well as EGFR transactivation and MAPK activation induced by Ang II, we observed that depletion of ARF6 only partially inhibited VSMC proliferation. However, inhibition of Nox activity by DPI was more effective in preventing Ang II-mediated cell proliferation. The more potent effect of this chemical inhibitor may depend on its ability to efficiently inhibit all Nox isoforms compared to ARF6, which may be selective for Nox1.

In sum, our study supports a new role for the GTPase ARF6 in ROS production and Ang II-induced VSMC proliferation. We demonstrate that ARF6 promotes ROS production by a mechanism involving the activation of Rac1 and Nox1 expression. Through ROS, ARF6 mediates EGFR transactivation and MAPK activation leading to VSMC proliferation (Fig 7). How ARF6 regulates Nox1 expression and whether ARF6 is implicated in the regulation of other proliferation pathways remains to be defined. Because of the key role ROS plays in cardiovascular diseases, ARF6 could be a new potential therapeutic target for the treatment of atherosclerosis, restenosis after angioplasty and hypertension.

Acknowledgments

We thank Dr. Hélène Girouard (Université de Montréal) for her help in measuring ROS production.

1.6. Fig legends

1.6.1. Fig 1. ARF6 controls Ang II-induced Rac1 activation

VSMC were stimulated for the indicated times with Ang II (100 nM) then lysed. (A). Endogenous levels of activated ARF6 (ARF6-GTP) captured by GST pulldown assay and total ARF6 (input) were assessed by Western blot analysis (n=4, *P < 0.05). (B). Activated and total Rac1 levels were also determined by Western blot analysis (n=3, **P < 0.01, ***P < 0.001). (C). VSMC were infected with scrambled or ARF6 shRNA lentiviruses. At the third day of infection, cells were serum starved for 48h and stimulated or not with Ang II for 5 min. Activated Rac1 was assessed as in (B). Quantifications are presented as fold-change over basal (cnt shRNA, t=0) and are normalized to total protein content (n=3, **P < 0.01).

1.6.2. Fig 2. Ang II-induced superoxide anion production is ARF6 dependent

(A) Control and ARF6 depleted VSMC were stimulated with Ang II (100 nM) for the indicated time and incubated with DHE. Images are representative of each condition. Cells were examined to confirm ARF6 knock down by Western blot. (B) Graph represents quantitative analysis of fluorescence intensity mean per cell presented as fold change over basal (scrambled shRNA, t=0). 3-4 images representative of 1000-1500 cells per time point of Ang II stimulation and per condition were analyzed using ImageJ software. DHE fluorescence were quantified and normalized to cells number following DAPI staining (n=3, *P < 0.05, **P < 0.01). (C) Quiescent control and ARF6 depleted VSMC were stimulated or not with AngII (100 nM, 60 min) and superoxide anion levels were measured using cytochrome C reduction assay as described in materials and methods (n = 3, *P < 0.05). (D) Control and Rac1 T17N overexpressing VSMC were stimulated or not with Ang II. Superoxide anion levels were then evaluated by DHE staining as in (A). Rac1 T17N overexpression was confirmed by Western blot analysis. (E) Results obtained in (D) were quantified by analysis of fluorescence intensity average per cell as in (B) (n=3, **P < 0.01).

1.6.3. Fig 3. ARF6 regulates Nox1 expression

(A) Nox1 and Nox4 protein expression was examined in control and ARF6 depleted VSMC using Western blot analysis. Levels of ARF6 and actin were also determined. Graph represents quantification of all data (n=3, ***P < 0.001). (B) mRNA levels of Nox1 and Nox4 were also assessed in cells infected with the control and ARF6 shRNA. Data were normalized to two control mRNA (GADPH and 4-HPRT) and presented as fold change over one control experiment (n=3, *P < 0.05). (C) Noxa1 and Noxo1 protein levels were measured in control and ARF6 depleted VSMC using Western blot analysis. Graph represents quantification of three independent experiments (n = 3). (D) Nox1 and Nox4 protein expression was also examined in control and Rac1 depleted VSMC as in (A) (n=3). (E) VSMC were transiently transfected with empty vector, HA-ARF6, HA-ARF6 T157A, HA-ARF6 T27N, myc-Rac1, myc-Rac1 Q61L or myc-Rac1 T17N and Nox1, actin, HA-tag and myc-tag levels were detected using Western blot analysis (n=3).

1.6.4. Fig 4. ARF6 mediates ROS-dependent EGFR transactivation

(A, B) Control and ARF6 depleted VSMC were stimulated with Ang II (100 nM) for the indicated times. EGFR phosphorylation levels on Tyr1086 (A) and Tyr845 (B) were assessed by Western blot analysis using specific phospho antibodies and data normalized to total EGFR (n=3, *P < 0.05, **P < 0.01). (C) Control and Rac1 T17N overexpressing VSMC were stimulated or not with Ang II for the indicated times and EGFR phosphorylation levels on Tyr1086 were determined by Western blot analysis (n=3, **P < 0.01, ***P < 0.001). (D) VSMC were pre-incubated with vehicle or DPI (10 μ M) and stimulated with Ang II (100 nM) for the indicated times. EGFR phosphorylation levels on Tyr1086 and Tyr845 were determined as in (A, B). Data are the mean \pm SEM of three independent experiments (n=3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). (E) VSMC were pre-incubated with vehicle, AG1478 (100nM) or ML171 (5 μ M) for 30 min then stimulated with Ang II (100 nM) for the indicated times. EGFR phosphorylation levels on Tyr1086 were measured as in (A) (n=3,***P < 0.001).

1.6.5. Fig 5. ARF6 is required for the activation of the ROS sensitive Erk1/2, p38 and Jnk

(A) Control and ARF6 depleted VSMC were stimulated with Ang II (100 nM) for the indicated times. Phosphorylation and total levels of Erk1/2, p38, and Jnk were examined (n=3, **P < 0.01). (B) Cells were treated with vehicle or DPI (10 μ M) and stimulated with Ang II (100 nM) for the indicated times. Phosphorylation levels of Erk1/2, p38 and Jnk were assessed as in (A). Results are representative of three independent experiments and quantifications are the mean \pm SEM (n=3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). (C) Cells were treated with vehicle, AG1478 (100 nM) or ML171 (5 μ M) for 30 min then stimulated with Ang II for the indicated times. Phosphorylation and total levels of Erk1/2, p38, and Jnk were assessed by Western blot analysis (n=3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

1.6.6. Fig 6. ARF6 mediates Ang II induced cellular proliferation through ROS

(A) Control and ARF6 depleted cells were stimulated or not with Ang II (100 nM) for the indicated times. Manual cell count was performed for each experimental condition (n=3, ***P < 0.001). (B) Proliferation of control and ARF6 depleted cells stimulated or not with Ang II was assessed using the MTT assay (n=3, ***P < 0.001). (C) Control and Rac1 T17N expressing cells were left untreated or stimulated with Ang II (100 nM) for 72h. Proliferation was assessed using the MTT assay as in (B) (n=3, **P < 0.01, ***P < 0.001). (D) Cells incubated with DMSO, AG1478 (100 nM), ML171 (5 μ M) or DPI (1 μ M) were stimulated or not with Ang II for 72h and proliferation was assessed using MTT assay (n=3, ***P < 0.001). (E). Cellular viability of control, ARF6 depleted and DPI treated cells stimulated or not with Ang II was determined using trypan blue (n=3)

1.6.7. Fig 7. Schematic representation of the molecular mechanism by which ARF6 mediates Ang II promoted ROS generation and proliferation of VSMC

Stimulation of the AT1R by Ang II leads to the activation of ARF6, which is essential for the activation of Rac1. This Rho GTPase acts to control NADPH oxidase and formation of ROS. These signaling intermediates play numerous roles in VSMC. They are essential for EGFR transactivation and MAPK phosphorylation. In addition, ARF6 can regulate Nox1 expression to further support ROS production. Altogether, our findings show that ARF6 is a molecular switch regulating cellular proliferation.

Fig 1.
Bourmoum et al.

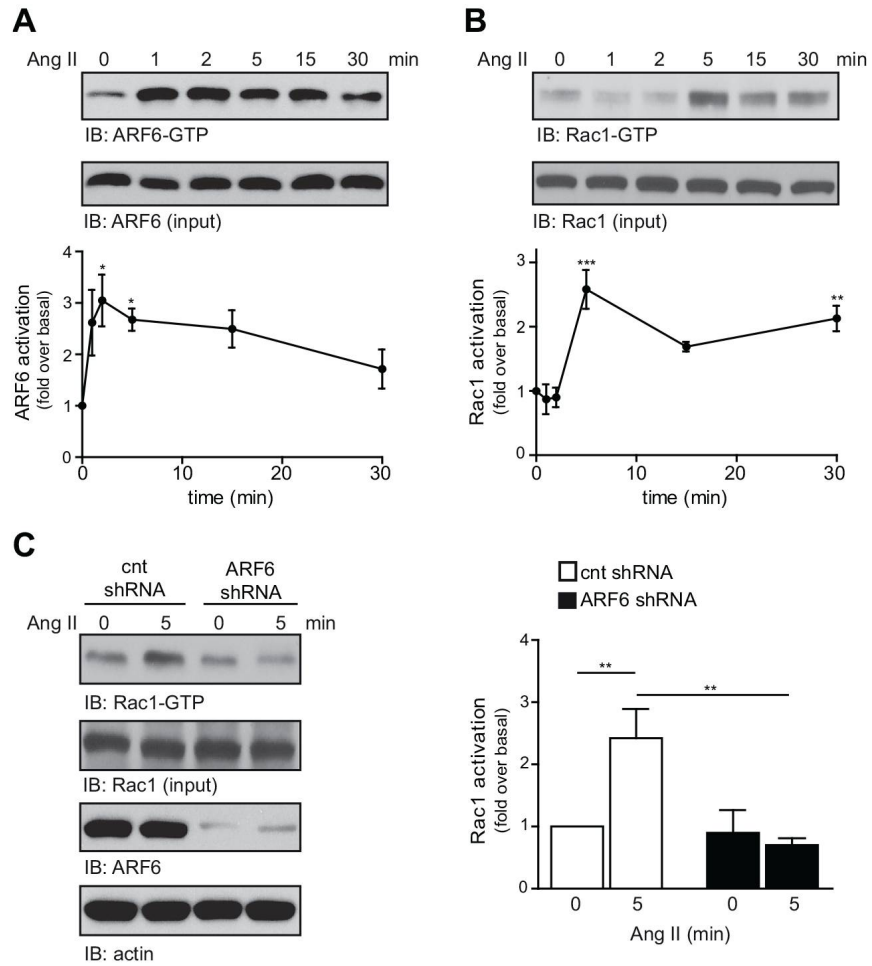


Figure 17. ARF6 controls Ang II-induced Rac1 activation

Fig 2.
Bourmoum et al.

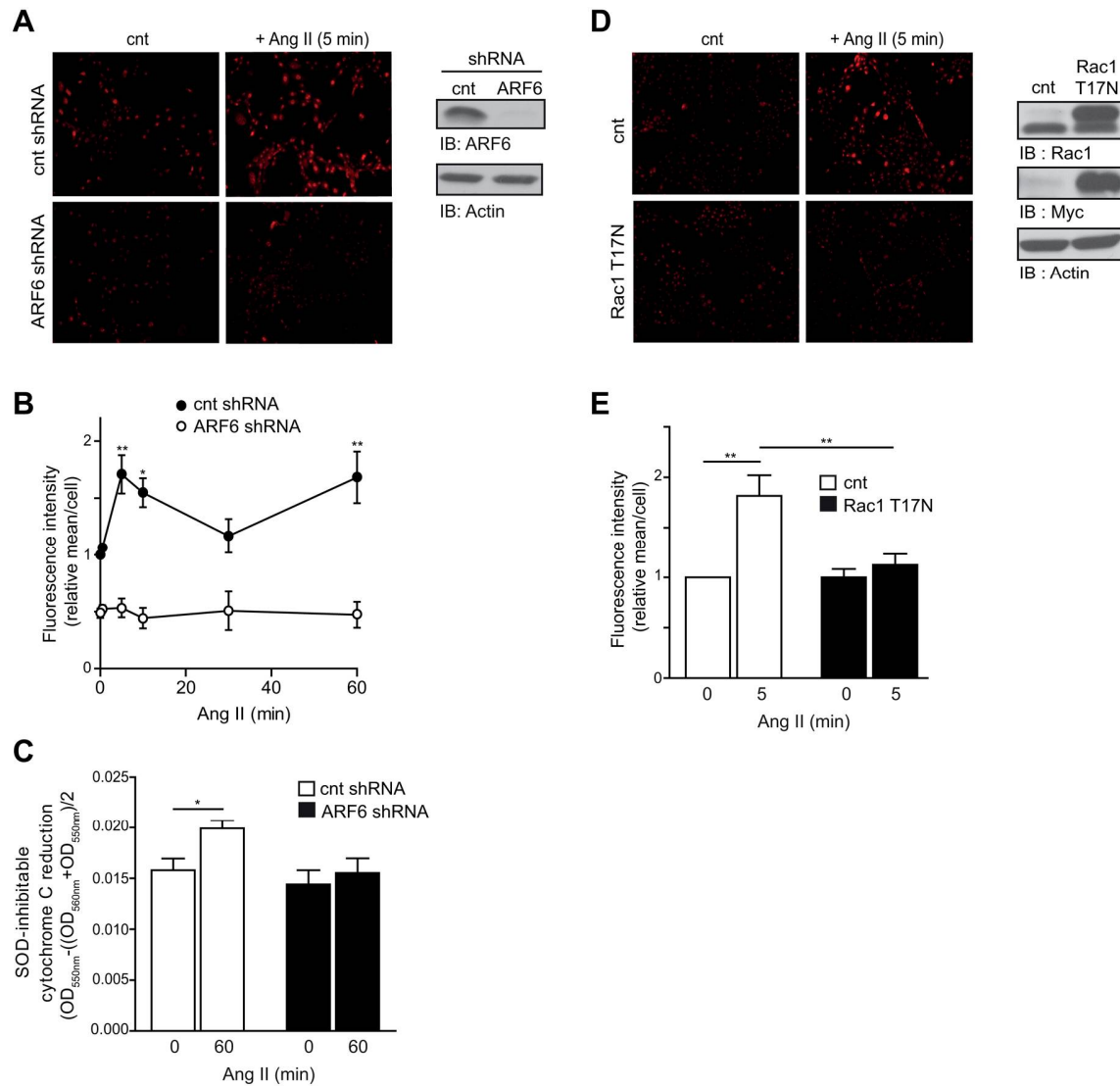


Figure 18. Ang II-induced superoxide anion production is ARF6 dependent

Fig 3.
Bourmoum et al.

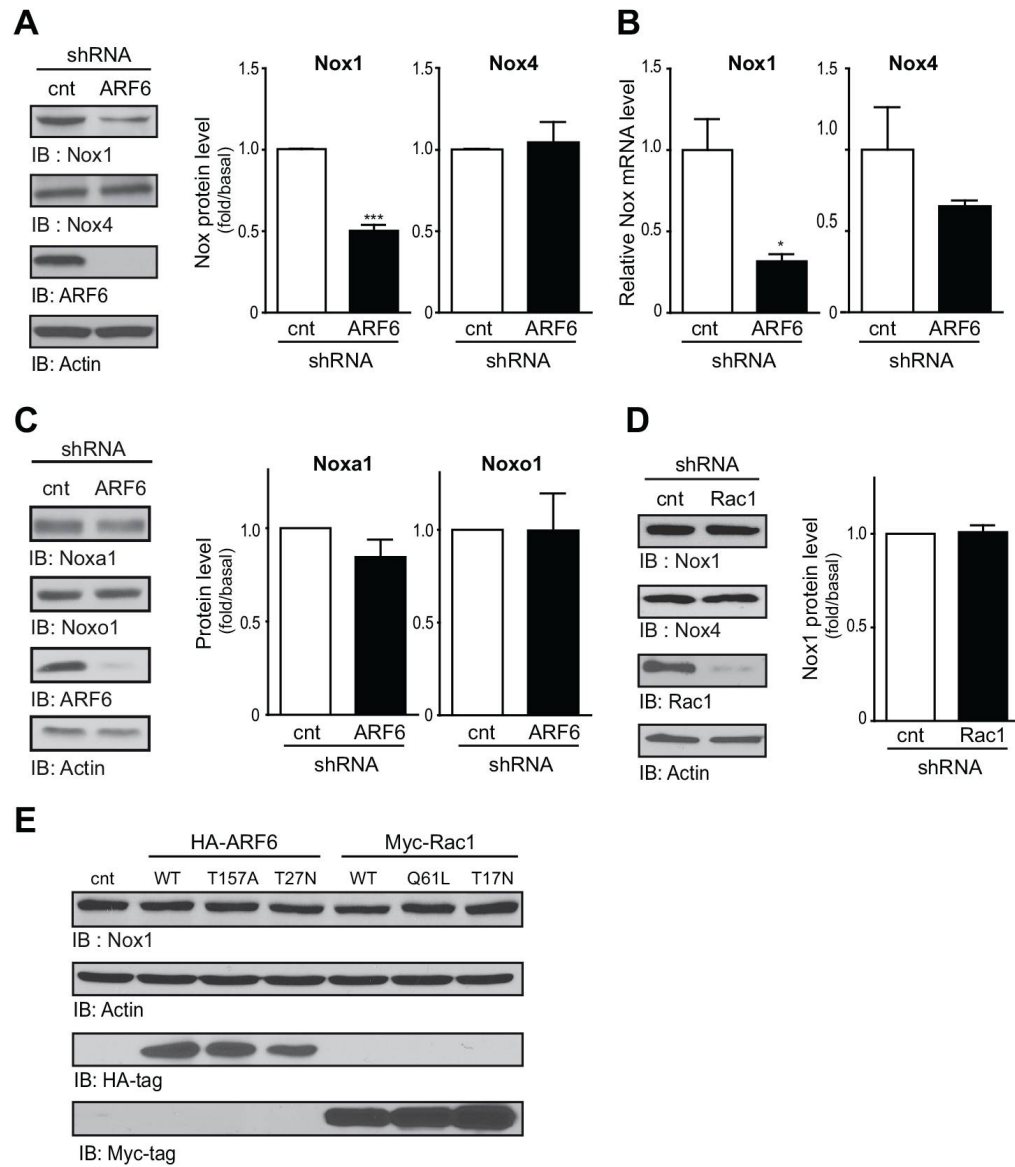


Figure 19. ARF6 regulates Nox1 expression

Fig 4.
Bourmoum et al.

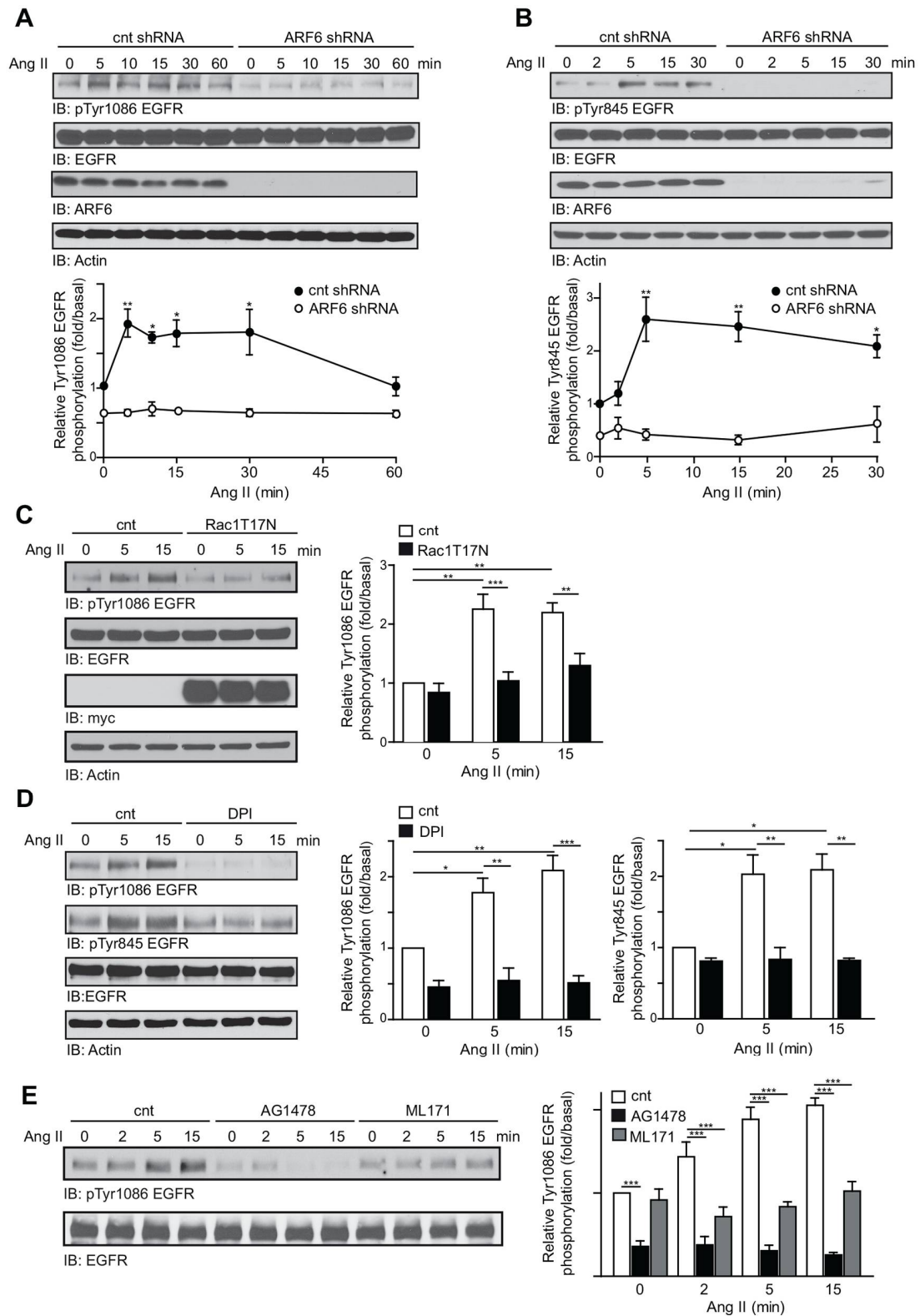


Figure 20. ARF6 mediates ROS-dependent EGFR transactivation

Fig 5.
Bourmoum et al.

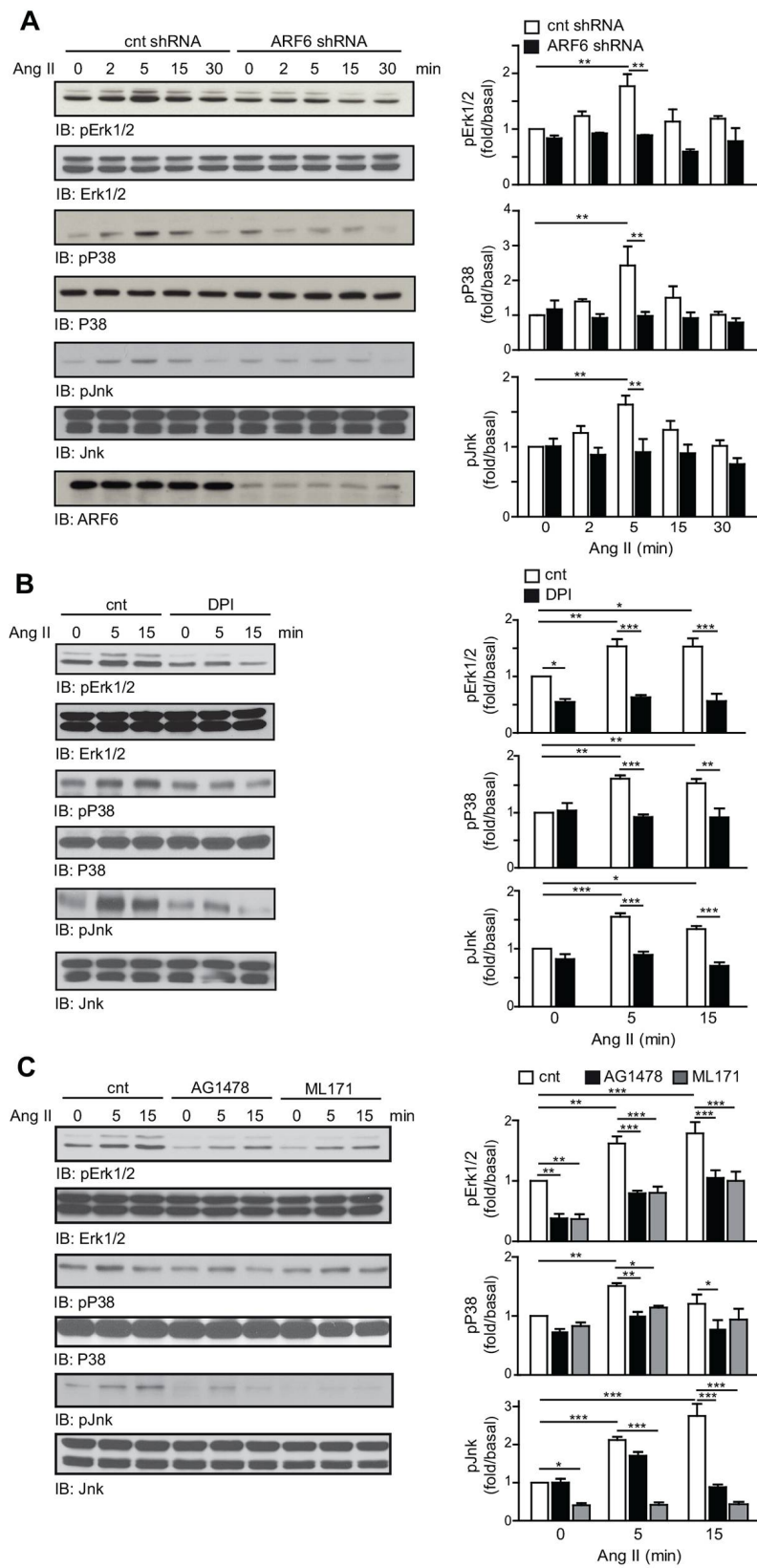


Fig 6.
Bourmoum et al.

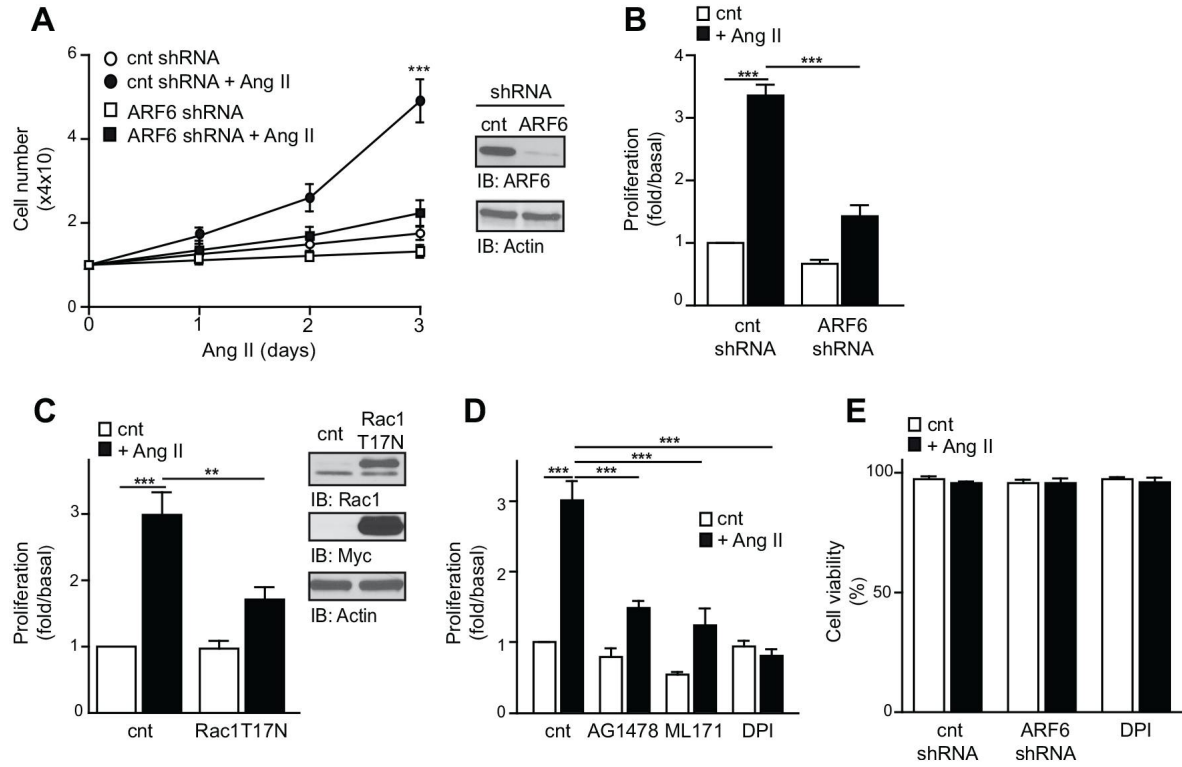


Figure 22. ARF6 mediates Ang II induced cellular proliferation through ROS

Fig 7.
Bourmoum et al.

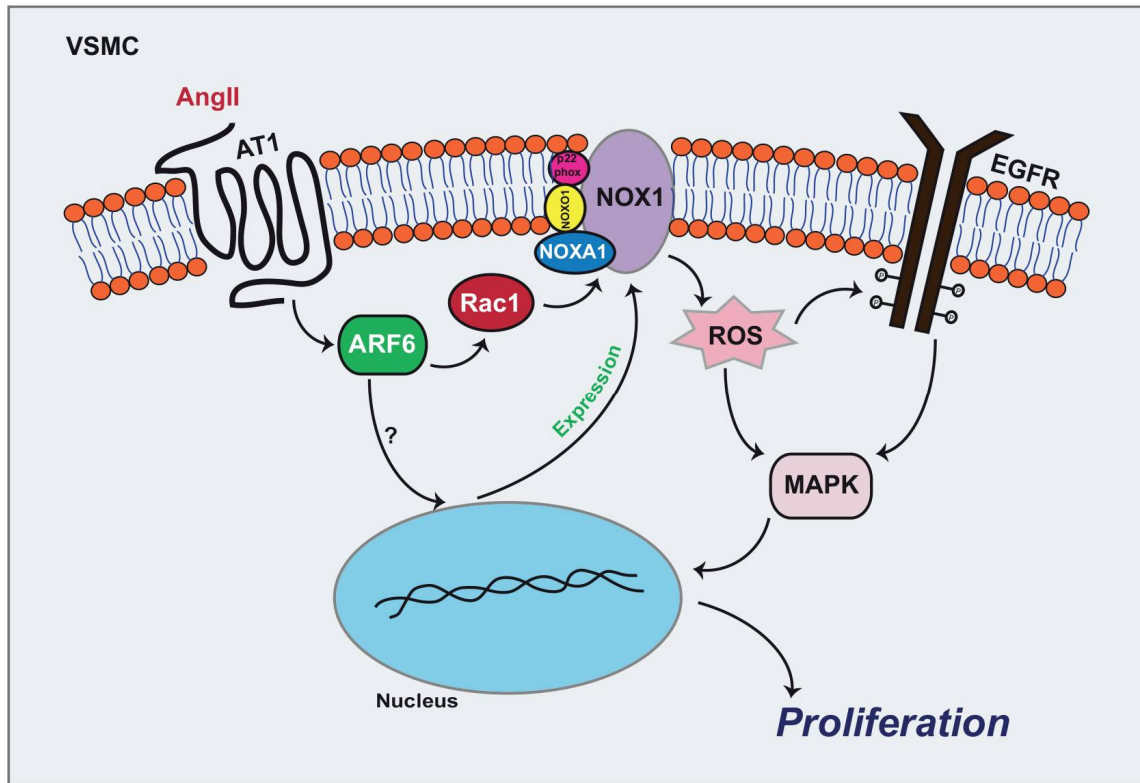


Figure 23. Schematic representation of the molecular mechanism by which ARF6 mediates Ang II promoted ROS generation and proliferation of VSMC

1.7. References

1. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation*. 1998;98(1):82-9. PubMed PMID: 9665064.
2. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8(11):1249-56. doi: 10.1038/nm1102-1249. PubMed PMID: 12411952.
3. Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*. 1986;58(4):427-44. PubMed PMID: 3516443.
4. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*. 1991;68(2):450-6. PubMed PMID: 1991349.
5. Huckle WR, Earp HS. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog Growth Factor Res*. 1994;5(2):177-94. PubMed PMID: 7919223.
6. Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006;7(1):3-14. doi: 10.3317/jraas.2006.003. PubMed PMID: 17083068.
7. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem*. 1998;273(31):19772-7. PubMed PMID: 9677408.
8. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK. Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1999;55(1):142-9. PubMed PMID: 9882708.
9. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):639-72. PubMed PMID: 11121512.

10. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(8):1263-73. doi: /S0100-879X2004000800018. PubMed PMID: 15273829.
11. Satoh K, Nigro P, Berk BC. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(5):675-82. doi: 10.1089/ars.2009.2875. PubMed PMID: 19747062; PubMed Central PMCID: PMC2861539.
12. Clempus RE, Griending KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):216-25. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.02.033. PubMed PMID: 16616906; PubMed Central PMCID: PMC1934427.
13. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griending KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 2002;91(5):406-13. PubMed PMID: 12215489.
14. Touyz RM, Yao G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(3):512-8. doi: 10.1161/01.ATV.0000154141.66879.98. PubMed PMID: 15618548.
15. Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res.* 2006;98(4):453-62. doi: 10.1161/01.RES.0000204727.46710.5e. PubMed PMID: 16514078.
16. Mifune M, Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima H, Brailoiu E, Dun NJ, et al. G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26592-9. doi: 10.1074/jbc.M502906200. PubMed PMID: 15905175.
17. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 1998;273(24):15022-9. PubMed PMID: 9614110.

18. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):940-8. PubMed PMID: 10764657.
19. Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81(2):159-67. doi: 10.1139/y02-164. PubMed PMID: 12710530.
20. Frank GD, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley ED. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology.* 2000;141(9):3120-6. doi: 10.1210/endo.141.9.7630. PubMed PMID: 10965882.
21. Pinzar E, Wang T, Garrido MR, Xu W, Levy P, Bottari SP. Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2005;579(22):5100-4. doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.019. PubMed PMID: 16139272.
22. D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):347-58. doi: 10.1038/nrm1910. PubMed PMID: 16633337.
23. Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Haucke V. ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol.* 2003;162(1):113-24. doi: 10.1083/jcb.200301006. PubMed PMID: 12847086; PubMed Central PMCID: PMC2172713.
24. Cotton M, Boulay PL, Houndolo T, Vitale N, Pitcher JA, Claing A. Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell.* 2007;18(2):501-11. doi: 10.1091/mbc.E06-06-0567. PubMed PMID: 17122362; PubMed Central PMCID: PMC1783798.
25. Ikeda S, Ushio-Fukai M, Zuo L, Tojo T, Dikalov S, Patrushev NA, et al. Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res.* 2005;96(4):467-75. doi: 10.1161/01.RES.0000158286.51045.16. PubMed PMID: 15692085.

26. Li M, Wang J, Ng SS, Chan CY, He ML, Yu F, et al. Adenosine diphosphate-ribosylation factor 6 is required for epidermal growth factor-induced glioblastoma cell proliferation. *Cancer*. 2009;115(21):4959-72. doi: 10.1002/cncr.24550. PubMed PMID: 19642173.
27. Knizhnik AV, Kovaleva OV, Komelkov AV, Trukhanova LS, Rybko VA, Zborovskaya IB, et al. Arf6 promotes cell proliferation via the PLD-mTORC1 and p38MAPK pathways. *J Cell Biochem*. 2012;113(1):360-71. doi: 10.1002/jcb.23362. PubMed PMID: 21928324.
28. D'Souza-Schorey C, Boshans RL, McDonough M, Stahl PD, Van Aelst L. A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J*. 1997;16(17):5445-54. doi: 10.1093/emboj/16.17.5445. PubMed PMID: 9312003; PubMed Central PMCID: PMC1170175.
29. Santy LC, Casanova JE. Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol*. 2001;154(3):599-610. doi: 10.1083/jcb.200104019. PubMed PMID: 11481345; PubMed Central PMCID: PMC2196419.
30. Albertinazzi C, Za L, Paris S, de Curtis I. ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Mol Biol Cell*. 2003;14(4):1295-307. doi: 10.1091/mbc.E02-07-0406. PubMed PMID: 12686588; PubMed Central PMCID: PMC153101.
31. Palacios F, D'Souza-Schorey C. Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J Biol Chem*. 2003;278(19):17395-400. doi: 10.1074/jbc.M300998200. PubMed PMID: 12609992.
32. Cai H, Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Detection of reactive oxygen species and nitric oxide in vascular cells and tissues: comparison of sensitivity and specificity. *Methods in molecular medicine*. 2007;139:293-311. PubMed PMID: 18287681.
33. Santy LC, Ravichandran KS, Casanova JE. The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr Biol*. 2005;15(19):1749-54. doi: 10.1016/j.cub.2005.08.052. PubMed PMID: 16213822.

34. Di Cesare A, Paris S, Albertinazzi C, Dariozzi S, Andersen J, Mann M, et al. p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat Cell Biol.* 2000;2(8):521-30. doi: 10.1038/35019561. PubMed PMID: 10934473.
35. Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L. Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol.* 2000;20(17):6354-63. PubMed PMID: 10938112; PubMed Central PMCID: PMC86110.
36. Balasubramanian N, Scott DW, Castle JD, Casanova JE, Schwartz MA. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol.* 2007;9(12):1381-91. doi: 10.1038/ncb1657. PubMed PMID: 18026091; PubMed Central PMCID: PMC2715295.
37. Brewer AC, Sparks EC, Shah AM. Transcriptional regulation of the NADPH oxidase isoform, Nox1, in colon epithelial cells: role of GATA-binding factor(s). *Free Radic Biol Med.* 2006;40(2):260-74. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.022. PubMed PMID: 16413408.
38. Lepore JJ, Cappola TP, Mericko PA, Morrissey EE, Parmacek MS. GATA-6 regulates genes promoting synthetic functions in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):309-14. doi: 10.1161/01.ATV.0000152725.76020.3c. PubMed PMID: 15591218.
39. Kim J, Ahn S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2009;284(18):11953-62. doi: 10.1074/jbc.M808176200. PubMed PMID: 19254952; PubMed Central PMCID: PMC2673264.
40. Samarakoon R, Higgins CE, Higgins SP, Higgins PJ. Differential requirement for MEK/ERK and SMAD signaling in PAI-1 and CTGF expression in response to microtubule disruption. *Cell Signal.* 2009;21(6):986-95. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.02.007. PubMed PMID: 19249354; PubMed Central PMCID: PMC2666018.

41. Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen species-sensitive p38MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36(1):49-56. PubMed PMID: 14734047.

42. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T. Antioxidants inhibit JNK and p38MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2001;24(3):251-61. PubMed PMID: 11409648.

Chapitre 2. ADP-ribosylation factor 6 is required for the metaphase/anaphase transition and its knockdown reveals new regulation of the ribosomal protein S6 during mitosis.

(Article en préparation)

Mohamed Bourmoum¹, Audrey Claing^{1*}

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

*Corresponding author

E-mail: audrey.claing@umontreal.ca (AC)

2.1. Abstract

Mitosis is a tightly controlled process that requires perfect timing of highly coordinated events. Mitotic defects are the principal cause of aneuploidy which is a most common feature of cancer cells. The GTPase ARF6 has been shown to play a role in cytokinesis. Here, we demonstrate using live cell microscopy combined with western blot and FACS analysis that ARF6 is required for the metaphase/anaphase transition as ARF6 depleted cells failed to enter anaphase. These cells were able to normally degrade cyclin A and complete chromosome congression. However, at the metaphase plate, chromosomes in ARF6 depleted cells were disorganized and dispersed and K-fibres were instable suggesting a failure of the establishment of correct bi-oriented kinetochore-microtubule attachments. As a result, cyclin B ubiquitination and its degradation in ARF6 depleted cells were blocked most likely because of the spindle assembly checkpoint (SAC). ARF6 depleted cells remained blocked at metaphase for hours or formed the prometaphase-like phenotype after scattering of chromosomes from the metaphase plate before ending up forming multinucleated cells. Also, by studying mTOR downstream components in ARF6 depleted cells blocked at mitosis, we discovered that the nuclear isoform of S6K1, p85S6K1, and the second member of S6Ks family, S6K2, are activated and acted to phosphorylate the ribosomal protein S6 during mitosis in a CDK1-dependent manner. Altogether, our findings highlight a new role for the GTPase ARF6 in the metaphase/anaphase transition and define new regulation of mTOR pathway during mitosis.

2.2. Introduction

Mitosis ensures the faithful segregation of sister chromatids to daughter cells, a process that involves five consecutive phases: prophase, prometaphase, metaphase, anaphase and telophase. The master mitotic kinase, Cyclin-Dependent Kinase1 (CDK1) drives mitotic events and coordinates transitions between different stages. CDK1 activation depends on the binding of mitotic cyclins (A and B) which accumulate and reach their maximal levels at the end of G₂ phase allowing CDK1 activation and entry into mitosis (Lindqvist, Rodríguez-Bravo et al. 2009). When cells enter mitosis, nuclear envelope breaks down, chromosomes become condensed and the mitotic spindle is formed. As cells progress from prometaphase to metaphase, chromosomes establish attachments to the spindle microtubules through kinetochores assembled on their centromeres. At metaphase, all chromosomes line up at the equator and kinetochore-microtubule attachments must be bi-oriented to the opposite spindle poles (Foley and Kapoor 2013). A surveillance system, the spindle assembly checkpoint (SAC), ensures the correct attachments of chromosomes to the mitotic spindle and delays anaphase until all chromosomes are correctly attached (Musacchio and Salmon 2007). SAC satisfaction releases Cdc20 allowing the activation of the E3 ubiquitin ligase, APC/C^{Cdc20} which ubiquitinates cyclin B (Pesin and Orr-Weaver 2008). Once ubiquitinated, cyclin B is rapidly targeted to degradation by the 26S proteasome leading to CDK1 inactivation (Murray, Solomon et al. 1989). Therefore, SAC satisfaction is a critical step for triggering the metaphase/anaphase transition (Musacchio and Salmon 2007).

The GTPase ARF6, the least conserved member of the ARF family of proteins, is localized at the plasma membrane and membranes of the endosomal compartments where it regulates endocytosis, organization of actin cytoskeleton and plasma membrane-endosomal traffic (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006). Like all GTP-binding proteins, ARF6 cycles between its inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) form. This cycling is controlled by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs). ARF6 has been shown to localize to the midbody formed between daughter cells at the end of telophase where it promotes the completion of cytokinesis through its interaction with the mitotic kinesin-like protein 1, MKLP1 (Makyio, Ohgi et al. 2012). In addition, it was proposed earlier that the role of ARF6 in completing cytokinesis is due to its regulation of the

endosomal-plasma membrane traffic (Schweitzer, Burke et al. 2005). Finally, we recently demonstrated that ARF6 mediates AngII-promoted proliferation (Bourmoum, Charles et al. 2016). In this study, we re-examined the role of ARF6 in mitosis in HEK293 cells and discovered that this GTPase is required for the metaphase/anaphase transition since ARF6 depleted cells were blocked at metaphase and failed to enter anaphase.

mTORC1 controls protein synthesis through direct phosphorylation of the translational regulators: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and the kinase of the ribosomal protein S6, S6K1 (Ma and Blenis 2009). The phosphorylation of 4E-BP1 prevents its binding to the cap-binding protein eIF4E allowing the formation of the eIF4F complex which is required for the initiation of cap-dependent translation. S6K1 activation promotes mRNA biogenesis, as well as translational initiation and elongation (Ma and Blenis 2009). Protein synthesis was generally thought to be inhibited during mitosis (Steward, Shaeffer et al. 1968). Furthermore, S6K1 was shown to be directly phosphorylated and negatively regulated by CDK1 during mitosis (Shah, Ghosh et al. 2003). However, more recent data reported that CDK1 is able to activate 4EBP1 independently of mTORC1 to sustain protein synthesis throughout mitosis (Shuda, Velasquez et al. 2015). Most studies focused on the p70S6K1 isoform known as S6K1 but S6Ks family comprises also the larger isoform of S6K1, p85S6K1 and the second member S6K2. Both exhibit a nuclear localization (Grove, Banerjee et al. 1991, Koh, Jee et al. 1999) yet less is known about their function. Our extended analysis of mTOR downstream components in ARF6 depleted cells revealed new insights into mTOR pathway regulation during mitosis. We show here that p85S6K1 and S6K2 isoforms are activated to mediate S6 phosphorylation during mitosis in a CDK1-dependent manner.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Reagents, antibodies and shRNAs

Hoechst 33342 was purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). RO3306 and Propidium Iodide (PI) were from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Rapamycin was

from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA). Puromycin from Invivogen (San Diego, CA, USA) and MG132 from MedChem Express (Monmouth Junction, NJ, USA). Antibodies against phospho-Histone H3 (Ser10), Histone H3, cyclin B1, cyclin A2, Pan-actin, ubiquitin, phospho-S6 (Ser235/236), S6, phospho-S6K1 (Thr389), phospho-S6K1 (Ser424), S6K1, phospho-4EBP1 (Thr37/46), phospho-4EBP1 (Thr70), 4EBP1 were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Anti ARF6 was from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA). Anti CENP-A was from Abcam (Toronto, ON, Canada). Anti α -tubulin was from Proteintech (Rosemont, IL, USA). Anti phospho-S6K2 (Ser423) from Assay biotech (Sunnyvale, CA, USA) and anti S6K2 from LifeSpan BioSciences (Seattle, WA, USA). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated antibodies were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). ARF6 shRNA and scrambled shRNA lentiviral plasmids (pLKO.1-puro) were provided as bacterial glycerol stocks by Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Lentiviruses were then produced in HEK293T cells using an adapted protocol from Laurie Ailles/Weissman Lab (Mississauga, Ontario, Canada) and Clontech protocols (Clontech Laboratories, Inc). Sequence of shARF6 is found in MISSION® shRNA Library, Sigma Aldrich (ARF6 shRNA, Clone ID: NM_001663.3-926s21c1, sequence: ACCGGAG CTGCACCGCATTATCAATGCTCGAGCATTGATAATG CGGTGCAGCTTTTTTTTG).

2.3.2. Cell culture and lentiviral transduction

HEK293 cells were cultured in EMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (Wisent, QC, Canada) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO₂). To deplete ARF6, the minimal lentiviruses concentration that induces maximal knockdown (95-100%) was first determined and used subsequently. For experiments, cells were infected with control (ctl) or ARF6 shRNA lentiviruses and media was changed after 8h. Cells were split after 48h and used at day 4 from lentiviral infection. In live cell, fluorescence and confocal microscopy experiments, cells were subjected to puromycin selection (10 µg/ml) at day 2 from lentiviral infection before they were used in experiments (day 4). For cell synchronization at G2/M border, cultured cells (day 3 from lentiviral

infection) were treated with the specific CDK1 inhibitor, RO3306 (9 μ M) for 14h then released by washing out RO3306.

2.3.3. Western blot

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 140 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi and 1mM orthovanadate, pH 7.4) complemented with protease inhibitors: aprotinin (5 μ g/ml), benzamidine (150 μ g/ml), leupeptin (5 μ g/ml), pepstatin (4 μ g/ml) and phenylmethanesulfonyl fluoride (1 mM). Total soluble proteins were then denatured and run on polyacrylamide gels then transferred onto nitrocellulose membranes. After BSA blocking, membranes were incubated with specific primary antibodies overnight. Horseradish peroxidase-conjugated Secondary antibodies were then added and proteins were detected by chemiluminescence (ECLTM Prime, GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada). The digital images obtained were quantified using ImageJ software.

2.3.4. GST pulldown assay

To measure ARF6 activation levels, we carried out GST-pull down assays. Briefly, cells were lysed in the same lysis buffer used for western blot and total soluble proteins were incubated on a rotator with GST-GGA3-glutathione-sepharose 4B beads for 1h at 4°C. ARF6-GTP bound to beads was then eluted, run on polyacrylamide gel and quantified using western blot.

2.3.5. Immunoprecipitation

To immunoprecipitate proteins, cells were lysed in TGH buffer (50 mM HEPES pH 7.3, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors: aprotinin (5 μ g/ml), benzamidine (150 μ g/ml), leupeptin (5 μ g/ml), pepstatin (4 μ g/ml) and phenylmethanesulfonyl fluoride (1 mM) and the phosphatase inhibitor

orthovanadate (1mM). In each condition, 700 µg of total lysate was incubated with 2 µg of the specific antibody overnight at 4°C in a rotator, then 40 µl of prewashed protein A/G plus-Agarose beads was added and sample was re-incubated for 2h at 4°C in a rotator. After 3 washes, proteins precipitated were eluted and detected using western blot.

2.3.6. Cell cycle, cell size and proliferation

For cell cycle analysis, cells were trypsinized, washed in PBS and fixed with ice cold ethanol (80%) dropwise while vortexing. Cells were kept in ethanol overnight at 4°C, then washed with PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 15min and washed again. After 1h incubation with RNase A (10 µg/ml), DNA was labeled with 50 µg/ml Propidium Iodide (PI) and cells were analyzed using FACS. Quantification of cell cycle populations was obtained using ModFit LT™ software. For cell size, Cells were trypsinized, washed and resuspended in PBS, then subjected to FACS analysis based on forward scatter/side scatter (FS/SSC). For proliferation assay, equal numbers (1 million) of control and ARF6 depleted cells (day 3 from lentiviral infection) were seeded to grow in complete medium (EMEM + 10% FBS) then manually counted using a hemocytometer after 2 days in culture.

2.3.7. Proteasome activity

The chymotrypsin-like activity of the proteasome was measured as in (Kisselev and Goldberg 2005). Cells were harvested in proteasome activity assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol) and lysed by passing 15 times through a 27-gauge needle attached to a 1-ml syringe. Lysates were centrifuged at 10000 g for 10min at 4°C and concentration of total proteins in supernatants was determined using the BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). 50 µg of proteins per well were transferred to a black 96-well plate with clear bottom (Corning, NY, USA) and incubated with 100 µM of the fluorogenic substrate, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo Life Sciences. Inc, NY, USA) for 1h at 37°C. Fluorescence (380 nm excitation, 460 nm emission) was measured with SpectraMax M2 microplate reader (Molecular devices

corporation, Sunnyvale, CA, USA). Fluorescence value were corrected by subtracting the blank value (fluorogenic substrate in buffer without lysate) and the mean of triplicates of each condition was taken.

2.3.8. Fluorescence, live cell and confocal microscopy:

For fluorescence microscopy, cells were grown on 24-well plate (BD Falcon) or glass bottom culture dish (Mat Tek corporation, MA, USA) coated with 0.1% gelatin. Cells were then fixed with 4% formaldehyde solution and DNA was stained with 3µg/ml Hoechst 33342 for 10 min. Cells were washed and maintained in PBS then images were immediately captured by Zeiss fluorescence microscope (Carl Zeiss, Inc, Germany) equipped with AxioCam MRm camera (Carl Zeiss, Inc, Germany) and Zeiss Zen software (Carl Zeiss, Inc, Germany) using 20X or 40X objective.

To perform live cell experiments, live-cell imaging culture chamber was installed on the microscope described above. Cells were grown on 24-well plate (BD Falcon) or glass bottom culture dish (Mat Tek corporation, MA, USA) coated with 0.1% gelatin and synchronized with RO3306 14h treatment. Hoechst (1 µg/ml) was added to the culture media 10 min before releasing cells by washing out RO3306 (changing the culture media). Plates or culture dishes were rapidly placed in the 37°C heated chamber (5% CO₂) and images were captured each 7.5 to 30 min during 2 to 6h (10 ms exposure time with the minimum intensity of the fluorescence lamp) using the 20X objective for the 24-well plate and the 40X objective for the glass bottom culture dish. Cell live videos were obtained and processed with Zeiss Zen imaging software (Carl Zeiss, Inc, Germany).

For confocal microscopy, cells were grown on glass coverslips coated with 0.1% gelatin, synchronized with RO3306 14h treatment, released for 70 min by changing the culture media then fixed with 4% formaldehyde solution. After 1h of blocking and permeabilization with 1.5% BSA solution containing 0.05% saponin, coverslips were incubated with the primary antibodies in the blocking solution (1/200) for 90 min, washed twice with PBS and incubated with secondary antibodies coupled with Alexa-Fluor-488/633 (Invitrogen) at 1/200 concentration for 90 min. DNA was stained with Hoechst 33342 (3µg/ml) for 10 min before

mounting coverslips with Aqua-Mount (Lerner Laboratories). Images were captured using Zeiss confocal microscope LSM800 (Carl Zeiss, Inc, Germany) controlled by Zeiss Zen imaging software. The same software was used for quantification of distances and fluorescence intensities on images.

2.3.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using t test, one-way or two-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test using GraphPad Prism (version 5, San Diego, CA, USA).

2.4. Results

2.4.1. Knockdown of ARF6 delays/blocks cells at mitosis

To elucidate the molecular mechanisms by which ARF6 acts to control proliferation, we first examined the impact of knocking down this GTPase on cell cycle progression. To investigate this, we studied the cell cycle of control and ARF6 depleted cells as illustrated in materials and methods. As shown in **Fig 1A**, depletion of ARF6 resulted in a 11% increase of percentage of cells in the G₂/M phase and a 12% decrease in the G₀/G₁ phase without affecting the S phase of the cell cycle. To better understand these findings, we also assessed the cell size and the proliferation rate of unsynchronized control and ARF6 depleted cells using FACS and cell counting, respectively. We found that average cell size of ARF6 depleted cells was 15% higher compared to control cells. However, the proliferation rate was strongly reduced (45%) after 2 days of culture in complete medium (**Fig S1**). In order to determine precisely in which phase of the cell cycle (G₂ or M) ARF6 depleted cells are blocked, we examined the phosphorylation state of Histone H3 (Ser10). Phosphorylation of this mitotic marker was much higher (3.2 fold) in cells infected with ARF6 shRNA compared to control cells (**Fig 1B**) indicating that ARF6 depleted cells were delayed or blocked at mitosis. In these experiments,

mitotic cyclin (cyclin B and cyclin A) protein levels were also assessed. Western blot analysis revealed that cyclin B protein levels were increased by 50% when ARF6 was knocked down. In contrast, cyclin A levels were slightly lower in these conditions (**Fig. 1B**). To confirm the specificity of this effect, we used another shRNA targeting a different sequence of Arf6 and we found that it also increased Histone H3 phosphorylation (data not shown). To further investigate the role of ARF6 in mitosis, unsynchronized control or ARF6 depleted cells were examined by fluorescence microscopy after labeling DNA with Hoechst 33342. Mitotic cells were easily identified as nuclear envelope breaks down and chromosomes become condensed during mitosis. Images were taken (> 2500 cells) and phenotypes of different mitotic stages were scored. Overall, mitotic index (percentage of total mitotic cells) was 4 times higher in ARF6 depleted cells than in control cells. The frequency of normal mitotic phenotypes including prometaphase, metaphase and anaphase/telophase was similar between control and ARF6 depleted cells. However, we noticed the presence of two abnormal mitotic phenotypes, which were specific to ARF6 depleted cells: the bi or multi polar spindle phenotype (0.5 % of total cells) and the second phenotype characterized by the presence of a metaphase plate at the equator with two groups of chromosomes positioned symmetrically at the two poles of the cell. This phenotype was predominant in ARF6 depleted cells (3% of total cells) and we referred to it as the "prometaphase-like" phenotype. In addition, ARF6 depletion heavily increased (10 fold) the number of cells with multi-lobed nucleus and bi/multi-nucleated cells.

2.4.2. ARF6 mediates the metaphase/anaphase transition

The prometaphase-like phenotype observed in ARF6 depleted cells could be a result of a chromosome congression defect or a delay at the metaphase stage which could cause a phenomena known as "cohesion fatigue", where scattering of chromosomes from the metaphase plate to the two poles of the cell occurs (Daum, Potapova et al. 2011). To test these two hypotheses, we performed live cell microscopy experiments. Control and ARF6 depleted cells were synchronized at the G₂/M border by treatment with the CDK1 inhibitor, RO3306. Cells were then released by washing out RO3306 and videos of mitosis were recorded. Analysis of live cell videos revealed that chromosomes alignment at the spindle equator

occurred normally in ARF6 depleted cells compared to control cells with a delay for few chromosomes (1-2) in some cells (**Fig 2**). In addition, the time spent from nuclear envelope breakdown (NEB) to form the metaphase plate was not affected by ARF6 depletion (59 ± 4.9 min for control cells versus 58 ± 4.5 min for ARF6 depleted cells) indicating that ARF6 is dispensable for chromosome congression. However, we observed that after forming the metaphase plate, only 49% of ARF6 depleted cells had completed the metaphase/anaphase transition compared to 89% of control cells. Nearly 37% of ARF6 depleted cells that entered mitosis were blocked at the metaphase stage or ended up forming the prometaphase-like phenotype after some chromosomes scattered gradually and symmetrically from the metaphase plate to the two poles of the cell. We also measured the time spent at the metaphase stage in cells that succeeded to enter anaphase and found that ARF6 depleted cells spent double the time (26 ± 4.9 min) at the metaphase stage compared to control cells (12 ± 1.1 min) (**Fig 2**). Even when ARF6 depleted cells succeeded to reach the anaphase phase and complete mitosis, multiple defects occurred including lagging chromosomes during anaphase and the formation of bi or multi-lobed nucleus in daughter cells after telophase (video not shown). Altogether these results suggest a role for ARF6 in the metaphase/anaphase transition.

2.4.3. ARF6 is needed for cyclin B but not cyclin A degradation

Cyclin B degradation is associated with the anaphase onset. Since ARF6 depleted cells were blocked at metaphase and failed to enter anaphase, we asked whether cyclin B degradation may be affected. To verify this, control and ARF6 depleted cells were synchronized at the G₂/M border with 14h RO3306 treatment, then released by washing out the inhibitor. Cells were lysed and Histone H3 phosphorylation, cyclin B and cyclin A protein levels were assessed (**Fig 3A**). Control and ARF6 depleted cells entered mitosis similarly after RO3306 release as Histone H3 phosphorylation increased heavily (12 fold) and was comparable between the two conditions 1h after release. Histone H3 phosphorylation was strongly reduced (75%) in control cells after 2h from release indicating a rapid mitotic exit and continued to decrease to very low levels with time. However, in ARF6 depleted cells, phosphorylation of Histone H3 was only mildly reduced (30 %) after 2h from release

indicating that these cells remained blocked at mitosis. Histone H3 phosphorylation continued to decrease slowly and remained high even after 6h from RO3306 release. These results were consistent with live cell experiments. Cyclin A and cyclin B levels were at their maximal levels at G₂/M border and were identical between control and ARF6 depleted cells. The time course of cyclin A protein level revealed that ARF6 depletion did not affect cyclin A degradation. In both conditions, cyclin A protein level was maintained after 1h from release and 35% of this cyclin was degraded after 2h. After 6h, 65% of cyclin A was similarly degraded in control and ARF6 depleted cells. In contrast, cyclin B degradation was altered in ARF6 depleted cells. After 1h from RO3306 release, cyclin B level remained unchanged and similar between control and ARF6 depleted cells. After 2h, cyclin B was massively degraded (50%) in control cells but remained elevated in ARF6 depleted cells (only a 15% decrease). After 6h, 87% of cyclin B was degraded in control cells versus only 45% in ARF6 depleted cells. Interestingly, time courses of Cyclin B degradation and Histone H3 phosphorylation correlated perfectly. We also performed cell cycle experiments of control and ARF6 depleted cells synchronized with 14h RO3306 treatment and released or not for 3h or 6h. FACS results were consistent with live cell and western blot experiments. After RO3306 release, control cells normally exit the G₂/M phase and entered the G₀/G₁ phase whereas most of ARF6 depleted cells remained blocked at the G₂/M phase (**Fig 3B**).

Given that ARF6 appeared to play a role in the metaphase/anaphase transition, we asked whether it is activated at the metaphase stage to mediate the anaphase onset. We know from live cell experiments that cells reach the metaphase stage after 60-75 min from RO3306 release. We therefore measured ARF6 activation in synchronized cells after 1h from RO3306 release. ARF6-GTP levels increased by 90% at metaphase (**Fig 3C**), supporting our hypothesis that ARF6 may play a role in the metaphase/anaphase transition.

Cyclin B degradation depends on ubiquitination of this cyclin by the E3 ubiquitin ligase, APC/C^{Cdc20}, and its subsequent targeting to the 26S proteasome. To investigate the cause of cyclin B degradation blockade in ARF6 depleted cells, we first assessed the ubiquitination state of this cyclin. Cells were synchronized with RO3306 for 14h then released for 1h and cyclin B was immunoprecipitated. As shown in **Fig 4A**, cyclin B ubiquitination was reduced when ARF6 was knocked down. Second, we measured the 26S proteasome activity in

unsynchronized control and ARF6 depleted cells. As illustrated in **Fig 4B**, no significant differences were observed between the two conditions indicating that ARF6 knockdown does not affect the degradation machinery. Surprisingly, the assessment of total ubiquitination in whole lysates from unsynchronized cells showed that total ubiquitinated proteins diminished by 37% in ARF6 depleted cells (**Fig 4C, 4D**).

2.4.4. ARF6 depletion alters chromosomes attachments to microtubules and their architecture at the metaphase plate

Cyclin B ubiquitination occurs only when the SAC is satisfied which requires the establishment of correct kinetochore–microtubule attachments on all chromosomes at the metaphase plate. We therefore studied the mitotic spindle and the alignment of chromosomes at the metaphase plate using confocal microscopy. Cells were synchronized with RO3306, then released to reach the metaphase stage (70 min), fixed and stained for immunofluorescence microscopy analysis. In control cells, microtubules (K-fibres) presented a very organized architecture and were thicker, more stretched and longer compared to microtubules in ARF6 depleted cells which were wavy, short and disordered indicating more instability of microtubules when ARF6 is knocked down (**Fig 5A**). The spindle pole to pole distance was quantified in 60 cells and was 25% longer in ARF6 depleted cells (**Fig 5A**). In these cells, we also noticed that lateral attachments of chromosomes to microtubules, at the metaphase plate, were very frequent. To better understand how chromosomes are positioned at the metaphase plate, we labeled chromosomes centromeres (CENP-A) and took front view images of metaphase plates (**Fig 4B**). We made sure that cells selected were at the metaphase stage by making a Z-plane scan, chromosomes formed a circle at the equator and we verified the absence of non aligned chromosomes. We then quantified the distance between the furthest centromeres at the metaphase plate by drawing a circle containing all centromeres and measuring the diameter of the circle. Analysis of 45-54 cells in each condition showed that the diameter of centromeres circle was significantly bigger (16%) in ARF6 depleted cells compared to control cells meaning that chromosomes became more dispersed at the metaphase plate when ARF6 was knocked down.

2.4.5. ARF6 depletion differently regulates the activity of mTOR pathway downstream components

When we examined the activity mTOR pathway components in unsynchronized control and ARF6 depleted cells (**Fig 6**), we observed very intriguing results. Although ARF6 depletion caused a 56% decrease in p70S6K1 phosphorylation (Thr389), it resulted in a 2.8 fold increase of ribosomal protein S6 phosphorylation (Ser235/236) suggesting that activation of an alternative kinase may be responsible for the activation of S6. To identify this upstream regulator of S6, in ARF6 depleted cells, we first verified the activity of RSK1, which was reported to directly phosphorylate S6 on Ser235/236 (Roux, Shahbazian et al. 2007). We found that RSK1 phosphorylation was not affected by ARF6 depletion (data not shown). We then examined other isoforms of S6Ks family. Interestingly, the phosphorylation of the nuclear isoform of S6K1, p85S6K1 hugely increased (8.3 fold) when ARF6 was knocked down. Additionally, p54S6K2, another nuclear isoform of S6Ks family, was found to be more phosphorylated (43%) in ARF6 depleted cells. We also analyzed 4EBP1 activity in control and ARF6 depleted cells. ARF6 depletion reduced the phosphorylation of β/γ isoforms, but strongly increased (10.5 fold) the phosphorylation of the isoform δ which is known to be specifically activated at mitosis (Shuda, Velasquez et al. 2015). These results were obtained from control and ARF6 depleted cells that were in culture for 48h (complete media). Paradoxically, when cells were serum starved then stimulated with serum (10% FBS), S6K1 and S6 were both activated similarly in control and ARF6 depleted cells (data not shown), demonstrating that the effect of ARF6 depletion on mTOR downstream components is not a direct effect and may be a consequence of the accumulation of cells at mitosis.

2.4.6. S6, p85S6K1 and p54S6K2 are activated at mitosis

To investigate whether S6 phosphorylation observed in ARF6 depleted cells could be a mitotic event, control and ARF6 depleted cells were synchronized at the G₂/M border (RO3306, 14h) then released and 6h time courses were performed (**Fig 7**). Histone H3 phosphorylation was used as a mitotic marker. We noticed a perfect correlation between S6 phosphorylation and mitosis. At G₂/M border, S6 phosphorylation was comparable between

control and ARF6 depleted cells then increased similarly by 2.8 fold at mitosis. After 2h from RO3306 release, S6 phosphorylation returned to the basal level in control cells as cells exit mitosis and continued to decrease reaching a very low level 4h after release. However, in cells depleted of ARF6, the S6 phosphorylation decrease was slower and correlated with a slower mitotic exit. After 6h from release, a residual S6 phosphorylation remained in ARF6 depleted cells which were still blocked at mitosis. Moreover, S6 phosphorylation thoroughly correlated with p85S6K1 and p54S6K2 phosphorylation suggesting that these kinases are activated during mitosis to phosphorylate the ribosomal protein S6. p85S6K1 phosphorylation was almost undetectable at the G₂/M border in both control and ARF6 depleted cells, hugely increased at mitosis, then declined as control cells exit mitosis. However, it remained high in ARF6 cells that were blocked at mitosis. We must emphasize that time courses of p85S6K1 and Histone H3 phosphorylation were entirely superimposables suggesting that p85S6K1 is exclusively active during mitosis, compared to p54S6K2 that showed a basal activation level before cell entry into mitosis. Total p54S6K2 levels were reduced after 3h from RO3306 and continued to decrease similarly in control and ARF6 depleted cells. Analysis of 4EBP1 activation time course confirmed that the δ isoform phosphorylation is also a specific mitotic event as it was absent at the G₂/M border and occurred only when cells entered mitosis. It then disappeared in control cells that exit mitosis but was maintained in ARF6 depleted cells that remained in mitosis. In contrast, β/γ isoforms activation inversely correlated with Histone H3 and δ isoform phosphorylation indicating that these isoforms (β/γ) are inhibited during mitosis.

2.4.7. S6, p85S6K1 and p54S6K2 activation is CDK1-dependent

To further investigate the mitotic activation of the ribosomal protein S6, we aimed to identify the mitotic kinase responsible of the activation of p85S6K1 and p54S6K2 which phosphorylate S6 during mitosis. We therefore examined the role of CDK1, the master mitotic kinase. Unsynchronized control and ARF6 depleted cells were treated with vehicle or the specific CDK1 inhibitor, RO3306, for 1h. As observed above (**Fig 6**), in basal conditions, S6, p85S6K1 and p54S6K2 activation was higher in ARF6 depleted cells that were blocked at mitosis (more Histone H3 phosphorylation). CDK1 inhibition caused a complete mitotic exit

as Histone H3 phosphorylation disappeared in both control and ARF6 depleted cells (**Fig 8**). S6 phosphorylation decreased in control (50%) and ARF6 depleted cells (80%) and became identical between the two conditions after CDK1 blockade. CDK1 inhibition also abolished p85S6K1 phosphorylation and reduced p54S6K2 phosphorylation in ARF6 depleted cells, which became similar to the control levels. We also assessed the implication of mTORC1. We found that inhibition of mTORC1 with rapamycin did not affect Histone H3 phosphorylation indicating no effect on mitosis. mTORC1 inhibition abolished S6 phosphorylation in control cells, but not in ARF6 depleted cells. A residual S6 activation (19%) was insensitive to rapamycin in ARF6 depleted cells, but was completely suppressed when CDK1 was concomitantly inhibited with mTORC1 (**Fig 8**). Surprisingly, p85S6K1 and p54S6K2 were completely insensitive to mTORC1 inhibition. We asked whether the residual S6 phosphorylation observed in ARF6 depleted cells treated with rapamycin could need more time to decrease because phosphatases may take more time to act on higher levels of phosphorylation. As illustrated in **Fig S2**, longer periods of rapamycin treatment slowly reduced S6 phosphorylation but were unable to abolish it. p85S6K1 and p54S6K2 remained insensitive to mTORC1 inhibition even after 3h of treatment.

2.5. Discussion

The GTPase ARF6 has previously been shown to play a role in the last step of mitosis, cytokinesis (Schweitzer, Burke et al. 2005, Makyio, Ohgi et al. 2012). Here, we demonstrate that ARF6 is required for the metaphase/anaphase transition during mitosis. First, we show, using three different techniques, that ARF6 depletion blocks or delays cells at mitosis. FACS analysis revealed that ARF6 depletion delays/blocks the transition from mitosis to G₀/G₁ since the increase in the G₂/M population observed in ARF6 depleted cells was accompanied with a comparable decrease of percentage of cells in G₀/G₁ without affecting the S phase population. The high level of Histone H3 phosphorylation, which is a mitotic marker, observed in ARF6 depleted cells confirmed that these cells are blocked/delayed at mitosis rather than G₂. From fluorescence microscopy experiments, we show that ARF6 depletion results in an increase of the mitotic index, which is mainly due to a specific abnormal mitotic phenotype that we called

the "prometaphase-like" phenotype (3 %) and to a lesser degree to the multipolar spindle phenotype (0.5 %). The prometaphase-like phenotype is characterized by a specific positioning of chromosomes in the cell, a group of chromosomes are lined up at the equator and the rest are positioned at the two poles of the cell. This phenotype is distinguishable from the normal prometaphase phenotype because of the symmetry of chromosomes positioning at the two poles. The bi-or multi-nucleated cells observed in abundance when ARF6 was depleted are the end products of the prometaphase-like and the multipolar spindle phenotypes as confirmed by live cell microscopy. These bi/multi-nucleated cells, combined with mitotic cells, could explain the 11% increase in the G₂/M population seen in FACS analysis. Live cell microscopy experiments clearly demonstrate that ARF6 mediates for the metaphase/anaphase transition. Although chromosomes congression in ARF6 depleted cells is normal and chromosomes take the same time as in control cells to line up at the metaphase plate, the anaphase onset is blocked in nearly half of ARF6 depleted cells. These cells either remain blocked at this stage for hours (3h to 4h) or form the prometaphase-like phenotype after chromosomes migrate symmetrically from the metaphase plate to the two poles of the cell (**Fig 2**). So, the prometaphase-like phenotype seen abundantly in unsynchronized ARF6 depleted cells is formed as a consequence of the metaphase/anaphase transition failure. A similar phenomenon called "cohesion fatigue" was previously reported describing an unscheduled separation of sister chromatids in cells delayed at metaphase (Daum, Potapova et al. 2011, Stevens, Gassmann et al. 2011). In the prometaphase-like phenotype, chromosomes begun to leave the metaphase plate after a 42 ± 20 min delay at the metaphase plate, a time frame comparable with previous studies (Stevens, Gassmann et al. 2011). The symmetry of chromosome dispersion from the metaphase plate suggests that these chromosomes are rather sister chromatids that separate and migrate to the spindle poles. In many ARF6 depleted cells, although some chromosomes (1 or 2) failed to line up, chromosomes began to scatter after a short time at the incomplete metaphase plate. This indicates that chromosome scattering, in the prometaphase-like phenotype, does not necessarily need a complete lining up of chromosomes at the metaphase plate. ARF6 depleted cells that succeeded to enter anaphase were almost all shortly delayed at metaphase and exhibited multiple defects when cells entered anaphase, in particular lagging chromosomes or multi-lobbed nucleus formation. Thus, the common consequence of ARF6 depletion is a metaphase delay. Then, the length of this metaphase

delay determines the fate of the cell. If the delay is short, cells can enter anaphase even with subsequent defects. However, when the metaphase delay is longer, cells are more likely to either remain blocked at metaphase for hours or form the prometaphase-like phenotype. After hours in the prometaphase-like phenotype, chromosomes decondensation results in a multinucleated cell (usually 3 nuclei) (video not shown). The fact that some ARF6 depleted cells succeeded to enter anaphase, whereas others remain blocked at metaphase or form a prometaphase-like phenotype, may be explained by the different efficiency of ARF6 depletion in each cell as some residual amount of ARF6 present may be sufficient to mediate the metaphase/anaphase transition. Although the metaphase blockage, in ARF6 depleted cells, has been commonly seen in live cell experiments, the score of this phenotype was very low in unsynchronized ARF6 depleted cells contrary to the prometaphase-like phenotype. This, most likely, occurs because all the metaphase blocked cells ended up forming the prometaphase-like or to a lesser extent the multipolar spindle phenotype after a long period in culture.

Cyclin A and cyclin B, the co-activators of CDK1 reach their maximal levels at the G₂/M border. When entering mitosis, cyclin A degradation occurs early usually before metaphase (den Elzen and Pines 2001, Geley, Kramer et al. 2001). In contrast, cyclin B degradation takes place at the end of the metaphase stage and is associated with the metaphase/anaphase transition (Chang, Xu et al. 2003). Our synchronization/release experiments show that cyclin A is normally degraded in ARF6 depleted cells entering mitosis. We note that, in our study, cyclin A degradation did not occur as early as previously reported (den Elzen and Pines 2001). After 1h from RO3306 release, there was no significant decrease in cyclin A level knowing that in live-cell experiments, our cells usually reach the metaphase plate after 60 to 75 min from RO3306 release. In contrast, cyclin B degradation was blocked in ARF6 depleted cells, which correlates perfectly with the metaphase blockage observed in live-cell assays. The high residual cyclin B levels seen in ARF6 depleted cells after hours from RO3306 release corresponds with the 39% of cells that failed the metaphase/anaphase transition. Thus, ARF6 depleted cells are blocked after they normally degrade cyclin A and before they degrade cyclin B, which explains the increase of cyclin B and the slight decrease of cyclin A levels in unsynchronized ARF6 depleted cells (**Fig 1B**). Furthermore, we show in **Fig 4**, that the proteasome activity in ARF6 depleted cells remains intact and cyclin B

degradation blockage is a result of the impairment of its ubiquitination, which is the targeting signal to the proteasome machinery. Thus, we assume that ARF6 depleted cells are blocked at the stage before the signal of cyclin B ubiquitination is triggered. Surprisingly, the total content of ubiquitinated proteins decreased after ARF6 depletion, which may suggest a defect in the global ubiquitination process. However, this could be a consequence of the effect of ARF6 depletion on the cell cycle as ubiquitination driven by APC/C^{Cdc20} and APC/C^{Cdh1} is known to increase throughout late mitosis and G₁ phase (Buschhorn and Peters 2006) and ARF6 depleted cells are unable to reach these stages. Further work is needed to determine whether this ubiquitination defect is a global effect or a mitotic specific event. APC/C^{Cdc20} ubiquitinates cyclin B only when the spindle assembly checkpoint is satisfied. This requires the correct kinetochore-microtubule attachments of all chromosomes at the metaphase plate (Musacchio and Salmon 2007, Pesin and Orr-Weaver 2008). When we studied the architecture of chromosomes at the metaphase plate and their attachments to the mitotic spindle using confocal microscopy, we found that chromosomes at the metaphase plate in ARF6 depleted cells are more dispersed and disorganized. In addition, microtubules (K-fibres) in these cells are unstable, spindle poles are more distant and chromosomes laterally attached to microtubules are very frequent. This suggests a failure of the establishment of correct bi-oriented kinetochore-microtubule attachments, which maintain SAC activated and prevent cyclin B ubiquitination. Based on our results, we conclude that although chromosomes in ARF6 depleted cells are able to line up at the metaphase plate, they are incapable of establishing correct attachments to microtubules. This maintains SAC activated, prevents cyclin B ubiquitination and results in a metaphase blockage. Our results suggest that chromosome congression can occur independently of the establishment of correct attachments. This is supported by with previous studies showing that chromosome congression can take place in the absence of bi-orientation, and bi-orientation is established at the spindle equator while lateral attachment is converted to end-on attachment (Cai, O'Connell et al. 2009, Magidson, O'Connell et al. 2011).

In the second part of our study, we provide evidence that the nuclear isoform of S6K1, p85S6K1, and the second member of S6K family, S6K2, are activated during mitosis in a CDK1 dependent manner to phosphorylate the ribosomal protein S6 independently of

mTORC1. Just because ARF6 depleted cells are blocked at mitosis (5% versus 1% in control cells), that does not allow us to draw certain conclusions about mTOR pathway regulation during mitosis from results of unsynchronized cells (**Fig 6**) for the reason that the big majority of cells are not at mitosis. However, these results were relevant because cells were maintained in complete culture media for 48h without changing the media, which is a sufficient time for the classical mTOR signal to be turned off in most of the cells that are not in mitosis. Our results show that p70S6K1 is clearly not the kinase responsible of S6 phosphorylation increase in ARF6 depleted cells as its activation goes in the opposite direction of S6 phosphorylation after ARF6 depletion. This led us to identify p85S6K1 and S6K2 as the kinases responsible of S6 phosphorylation during mitosis. We suggest that the decrease of S6K1 phosphorylation, in unsynchronized ARF6 depleted cells, is related to non mitotic cells. This may imply the ARF6/PLD/PA/mTOR/S6K1 axis since ARF6 is known to activate PLD to generate phosphatidic acid (PA) (Brown, Gutowski et al. 1993) and PA, in turn, activates mTOR and its substrate S6K1 (Fang, Vilella-Bach et al. 2001). Our findings from synchronization/release experiments show that p85S6K1 and S6K2 are activated during mitosis to phosphorylate S6. Phosphorylation of the three proteins correlates perfectly with Histone H3 phosphorylation, indicating that these are specific mitotic events. We propose that p85S6K1 is the major player in the mitotic phosphorylation of S6 as its activation is exclusively mitotic since it was absent before entering mitosis, occurred massively during mitosis and completely disappeared after the mitotic exit. S6K2 also contributes to the mitotic S6 phosphorylation because its activation correlates with S6, but most likely to a lesser degree than p85S6K1. In addition, S6K2 seems to be gradually degraded after 2h from entry into mitosis in a similar way between control and ARF6 depleted cells contrary to its phosphorylation, which was maintained in ARF6 depleted cells suggesting that S6K2 degradation is triggered independently of the anaphase onset. Our results from synchronization /release experiments also confirmed that the δ 4EBP1 isoform is activated exclusively at mitosis. This confirmed the recent findings indicating that the δ isoform of 4EBP1 is directly phosphorylated and activated by CDK1 during mitosis (Shuda, Velasquez et al. 2015). In contrast, β and γ 4EBP1 isoforms are inhibited during mitosis and their activation re-emerge gradually after mitotic exit. β and γ 4EBP1 isoform mitotic inhibition may imply CDK1. In our study, 4EBP1 isoforms were named based on previous reports (Shuda, Velasquez et al. 2015). Nonetheless, it is possible that the isoform assumed to

be the δ isoform is no more than the α , β or γ 4EBP1 isoform that was additionally phosphorylated during mitosis resulting in a shifted band on the Western blot gel since, in all experiments, the δ 4EBP1 isoform inversely correlate with other isoforms, in particular isoforms α and β (**Fig 6 and 7**). Our data (**Fig 8**) show that the mitotic activation of p85S6K1, S6K2 and their substrate S6 are all CDK1-dependent. S6 phosphorylation decreases and become similar between control and ARF6 depleted cells after CDK1 inhibition, which confirms that the difference observed initially is due to different percentage of mitotic populations. The residual S6 phosphorylation after CDK1 inhibition can be attributed to non mitotic cells, given that CDK1 is a mitotic kinase and its activity is limited to mitosis. S6K2 activity correlates with S6 and same conclusions can be extrapolated on it. We must point out that p85S6K1 activation is totally CDK1-dependent, further supporting its proposed role as the major kinase responsible of S6 mitotic phosphorylation. We demonstrate that p85S6K1 and S6K2 phosphorylation are completely insensitive to mTORC1 inhibition even after a sustained treatment. mTORC1 inhibition was able to abolish S6 phosphorylation in control cells, but only decreased it in ARF6 depleted cells. This further supports our model, since control cells are not blocked at mitosis and S6 phosphorylation is completely mediated by mTORC1, whereas ARF6 depleted cells are heavily blocked at mitosis and S6 phosphorylation is mainly mediated by p85S6K1 and S6K2 in a CDK1-dependent manner. The contribution of CDK1 and mTORC1 in S6 mitotic phosphorylation is not completely separable because the effects of their inhibition on S6 phosphorylation are not additive (total S6 phosphorylation without inhibitors is not equal to S6 phosphorylation with RO3306 + S6 phosphorylation with rapamycin) (**Fig 8**). Therefore, we propose that CDK1 may activate independently both pathways (mTORC1/S6K1 and p85S6K1/S6K2) to phosphorylate S6 during mitosis. It is clear that p85S6K1 and S6K2 are phosphorylated during mitosis to activate S6, but the direct effect of CDK1 is questionable as CDK1 inhibition forces the mitotic exit. Hence, the sensitivity of p85S6K1, S6K2 and S6 to CDK1 inhibition may be a result of the mitotic exit rather than the CDK1 inhibition itself. However, inhibition of Aurora B, a mitotic kinase that phosphorylates Histone H3, results in mitotic exit without affecting S6 phosphorylation (data not shown), which suggests that the mitotic phosphorylation of p85S6K1, S6K2 and S6 are most likely to be directly related to CDK1. To confirm that CDK1 directly phosphorylates p85S6K1/S6K2, in vitro kinase assays are needed. In summary, we provide evidence of new role of two less

known S6Ks. We demonstrate that p85S6K1 and S6K2 are activated during mitosis to phosphorylate S6 in a CDK1-dependent manner, which may explain the previously reported nuclear localization of these two kinases (Grove, Banerjee et al. 1991, Koh, Jee et al. 1999).

2.6. Figure legends

2.6.1. Figure 1. ARF6 depletion delays/blocks cells at mitosis

All experiments of this figure were carried out with unsynchronized control (ctl) and ARF6 depleted cells (day 4 from lentiviral infection) maintained in complete culture media. **A/** cells were trypsinized, fixed and subjected to cell cycle analysis using FACS (10,000 events/condition). Quantification of cell populations in different stages was performed using ModFit LT™ software (n=4). **B/** Cells were lysed and the indicated proteins were detected using western blot (n=3). **C/** Cells cultured in 24-well plate or glass bottom culture dish were fixed, DNA was labeled with Hoechst (3µg/ml) and images were captured with fluorescence microscope. The representatives images shown were taken with 40X objective from cells cultured in glass bottom culture dish (better image quality). For quantifications, both 24-well plates and glass bottom culture dishes were used and images were captured with 20X or 40X objectives. A total of 2418 control cells and 2538 ARF6 depleted cells from three independent experiments were analyzed (n=3). (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

2.6.2. Figure 2. ARF6 mediates the metaphase/anaphase transition

A/ Control (ctl) and ARF6 depleted cells cultured in complete medium were blocked at the G₂/M border with 6-8 hours RO3306 treatment (9µM), Hoechst (1µg/ml) was added for 10 min, the media was then replaced and cells were immediately placed in the live-cell culture chamber of the microscope. Mitosis videos were recorded (3-6 hours time-lapse imaging every 7.5 min to 30 min) as described in materials and methods. Selected images from videos are presented. In ARF6 depleted cells, the two major mitotic phenotypes are shown, chromosomes

were either blocked at the metaphase plate (upper images) or migrated gradually from the metaphase plate to the cell poles to form the prometaphase-like phenotype (lower images). **B/** Analysis of mitosis videos in 27 control cells and 44 ARF6 depleted cells from 4 different experiments using Zeiss Zen imaging software. Time spent from nuclear envelope breakdown, NEB (first visible mitotic event) to form the metaphase plate and time spent from chromosome lining up at metaphase to anaphase onset were measured in videos analyzed. We also scored cells that succeeded to reach anaphase, cells that were blocked at metaphase or formed a prometaphase-like phenotype and cells that exhibited other defects including chromosomes congression defect and multipolar spindle (n=4). (*P < 0.05, **P < 0.01).

2.6.3. Figure 3. Cyclin B but not cyclin A degradation requires ARF6 and ARF6 is activated at metaphase

A/ ARF6 is required for cyclin B but not cyclin A degradation. Control (ctl) and ARF6 (A6) depleted cells were synchronized at G₂/M border with 14h RO3306 treatment, released by changing the culture media and lysed at the indicated times from RO3306 release, time 0 means that cells were not released. Lysates were subjected to western blot analysis to assess the indicated proteins (n=4). **B/** Cell cycle analysis of synchronized control and ARF6 depleted cells. Control (ctl) and ARF6 depleted cells were synchronized at the G₂/M border with 14h RO3306 treatment, released or not for 3h or 6h, cells were trypsinized, fixed and subjected to cell cycle analysis using FACS. Results presented are representative of three independent experiments (n=3). **C/** ARF6 is activated at metaphase. HEK293 cells were synchronized at G₂/M border with 14h RO3306 treatment, released or not for 1h, cells were lysed and ARF6 activation (ARF6 bound to GTP) was measured using GST pulldown assay as described in materials and methods (n=3). (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

2.6.4. Figure 4. ARF6 depletion reduces cyclin B ubiquitination without affecting proteasome activity

A/ Cyclin B ubiquitination: Control (ctl) and ARF6 depleted cells were synchronized with 14h RO3306 treatment, released for 75min and lysed in IP buffer. Cyclin B was immunoprecipitated and ubiquitinated cyclin B was detected using western blot. Proteins were also assessed in total lysates (n=2). **B/ Proteasome activity:** Unsynchronized control and ARF6 depleted cells (day 4 from infection) were treated with DMSO or MG132 (1 μ M or 10 μ M) for 30 min then harvested in proteasome buffer and proteasome activity was measured as described in materials and methods (n=3). **C/ Total ubiquitination:** Unsynchronized control and ARF6 cells were lysed and ubiquitinated proteins levels in total lysates were determined using western blot (n=3). **D/** Cells as in (C) were treated with DMSO or MG132 (10 μ M) for 1h or 4h, lysed and total ubiquitinated proteins were determined using western blot (n=3). (*P < 0.05, **P < 0.01).

2.6.5. Figure 5. ARF6 depletion affects chromosomes positioning and attachments to microtubules at the metaphase plate

Control (ctl) and ARF6 depleted cells grown on glass coverslips were synchronized with 14h RO3306 treatment then released for 70 min, fixed and prepared for confocal microscopy. **A/** Images show chromosomes (Hoechst) at the metaphase plate (side view) and the mitotic spindle microtubules (tubulin). Mitotic pole to pole distance was measured with Zeiss Zen software (in ~ 60 cells from three different experiments) and presented in the graph (n=3). **B/** Images show chromosomes (Hoechst) at the metaphase plate (front view) and centromeres (CENP-A). To assess chromosome dispersion, circle containing all centromeres at the metaphase plate was drawn using Zeiss Zen software and circle diameter was measured. Analysis of 45 to 54 cells from three different experiments is presented in the graph (n=3). (**P < 0.01, ***P < 0.001).

2.6.6. Figure 6. ARF6 depletion differently regulates mTOR pathway downstream components

Unsynchronized control (ctl) and ARF6 depleted cells (day 4 from lentiviral infection) were lysed and the indicated proteins were assessed using western blot analysis (n = 3-5). (*P < 0.05, **P < 0.01).

2.6.7. Figure 7. S6, p85S6K1 and p54S6K2 are activated during mitosis

Control (ctl) and ARF6 (A6) depleted cells were synchronized with 14h RO3306 treatment, released by washing out RO3306 for the indicated times (time 0 means that cells were not released) then lysed. Total lysates were used for western blot experiments to detect the indicated proteins (n=3). (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

2.6.8. Figure 8. S6, p85S6K1 and p54S6K2 mitotic activation is CDK1-dependent

Unsynchronized control (ctl) and ARF6 (A6) depleted cells were treated with DMSO, RO3306 (9μM), rapamycin (20nM) or RO3306+rapamycin for 1h then lysed and the indicated proteins are detected using western blot (n=3). (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

2.6.9. Figure S1. ARF6 depletion increases average cell size and decreases proliferation rate

A/ Cell size: Unsynchronized control and ARF6 depleted cells (day 4 from lentiviral infection) were trypsinized and subjected to FSC/SSC scan by FACS. cell size (FSC) was measured in 4 experiments and presented as the mean ± SEM in the graph (n=4). **B/ proliferation:** Equal number (1 million) of Control and ARF6 depleted cells (day 3 of

lentiviral infection) were plated to grow in complete medium. After 48h, cells were trypsinized and manually counted (n=3). (*P < 0.05, ***P < 0.001).

2.6.10. Figure S2. (related to Figure 8). The implication of mTORC1 in S6, p85S6K1 and p54S6K2 activation

Unsynchronized control and ARF6 depleted cells were treated with DMSO or rapamycin (20nM) for 1h, 2h or 3h, lysed and subjected to western blot analysis (n=3).

Figure 1
Bourmoum et al.

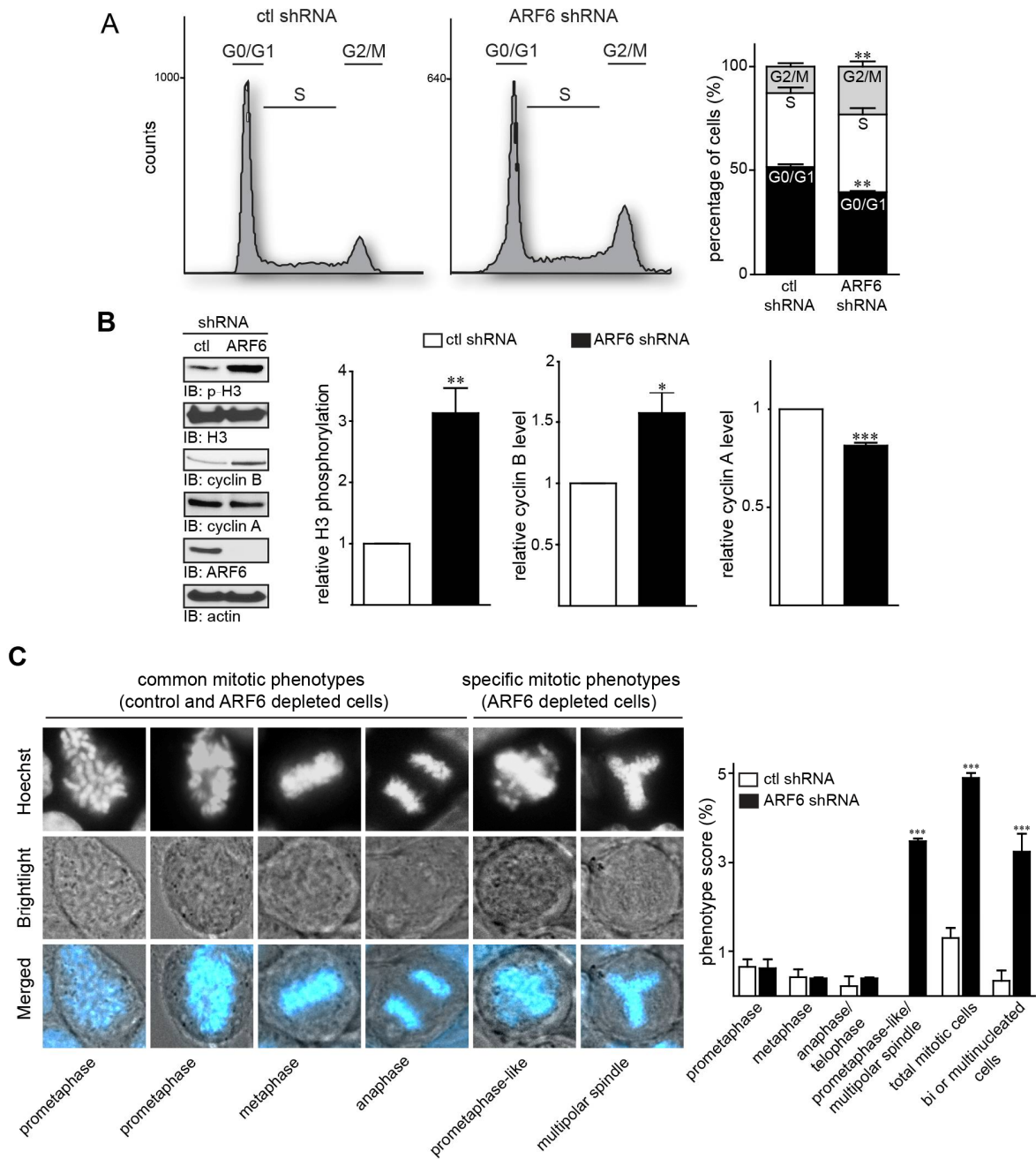
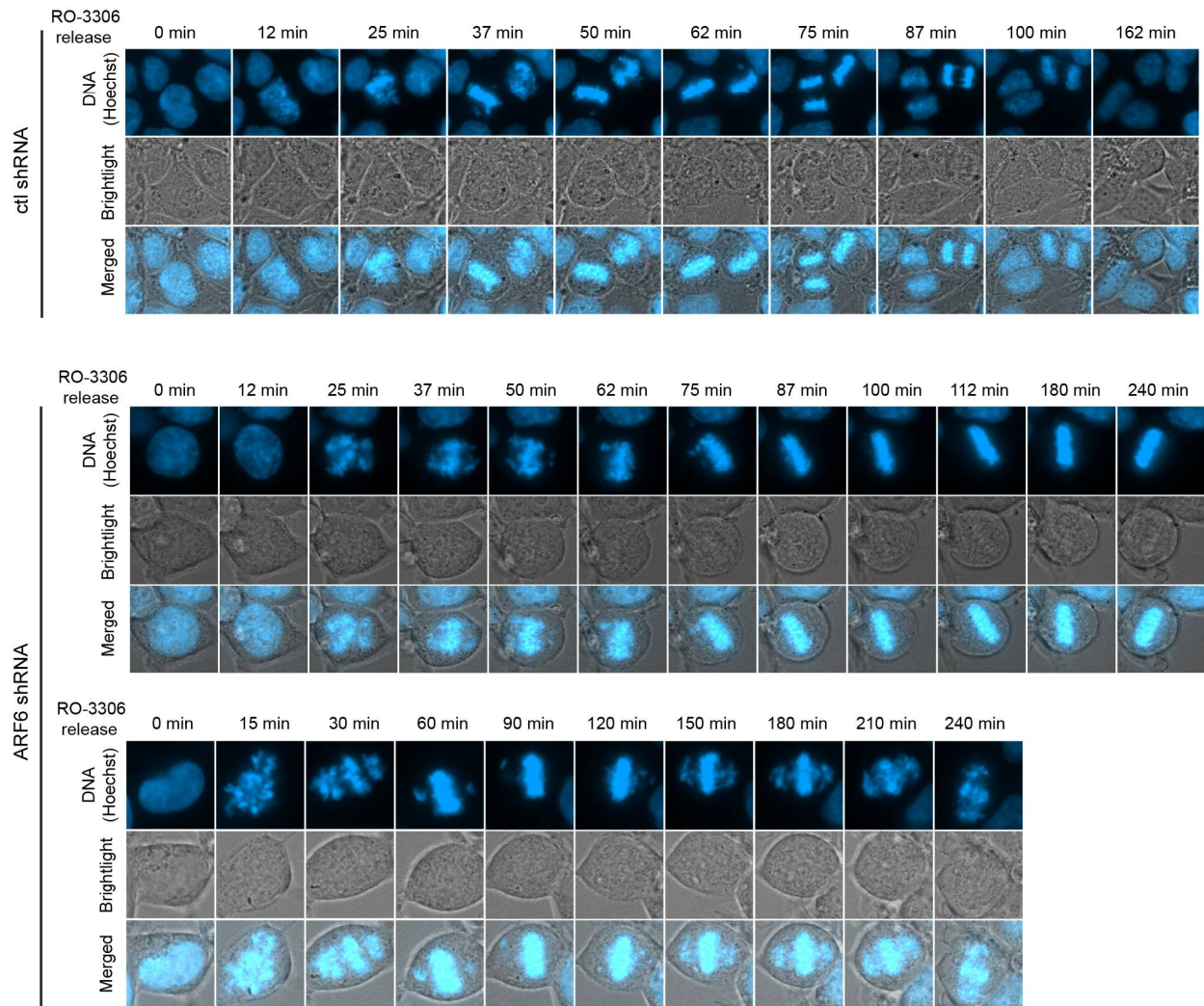


Figure 24. ARF6 depletion delays/blocks cells at mitosis

Figure 2
Bourmoum et al.

A



B

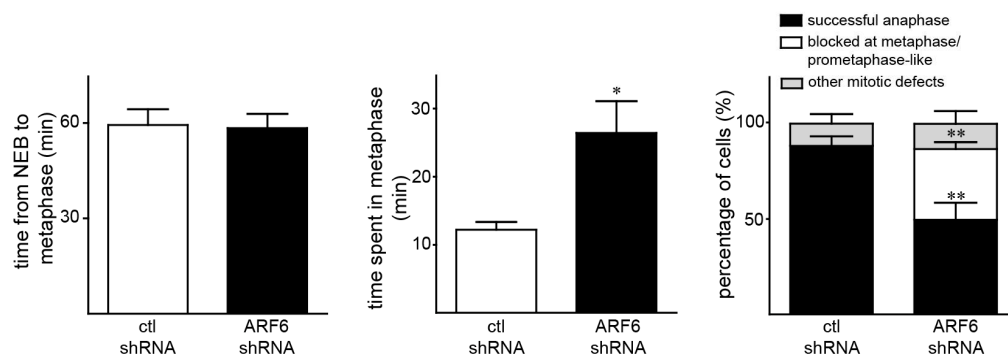


Figure 25. ARF6 mediates the metaphase/anaphase transition

Figure 3
Bourmoum et al.

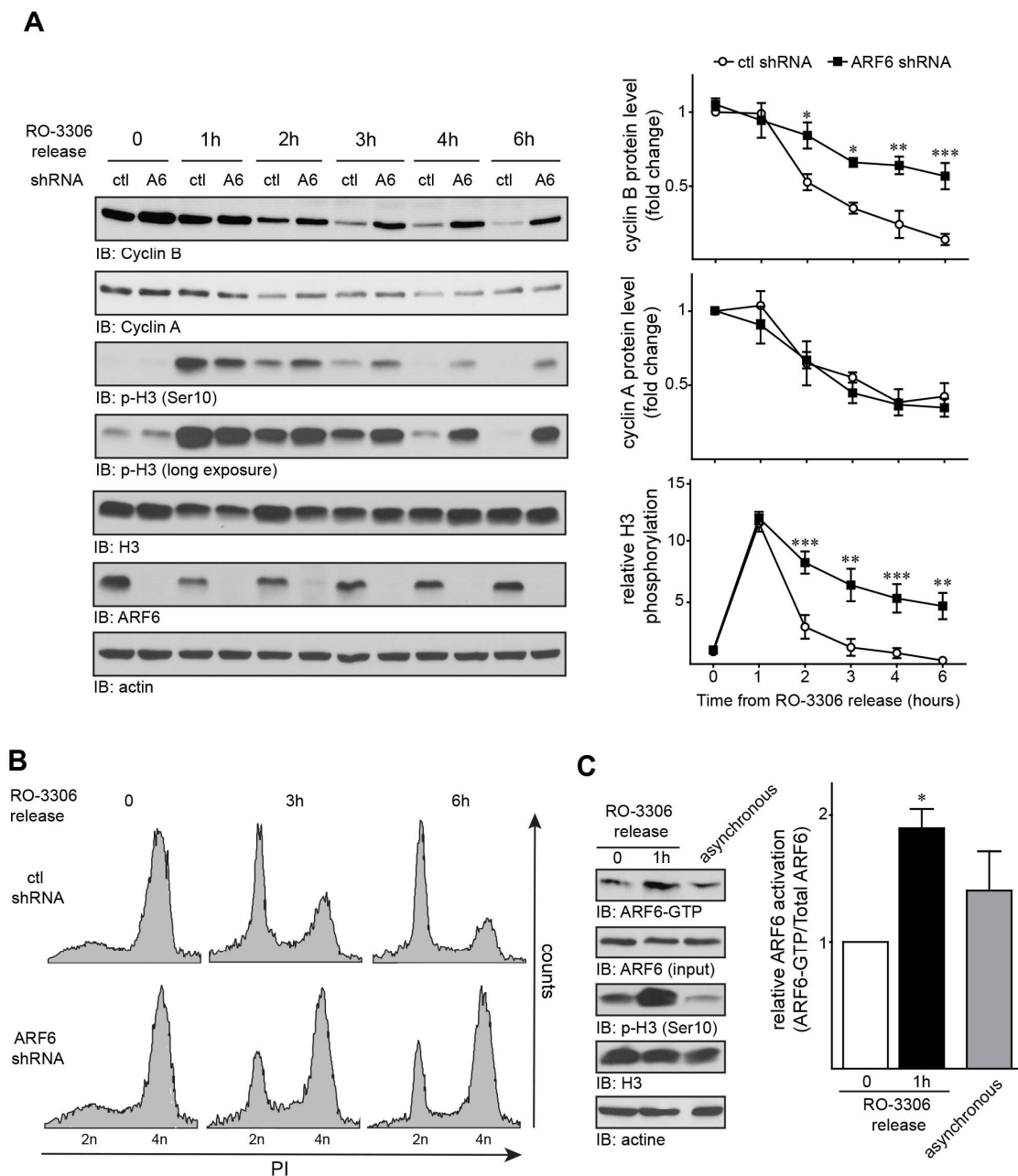


Figure 26. Cyclin B but not cyclin A degradation requires ARF6 and ARF6 is activated at metaphase

Figure 4
Bourmoum et al.

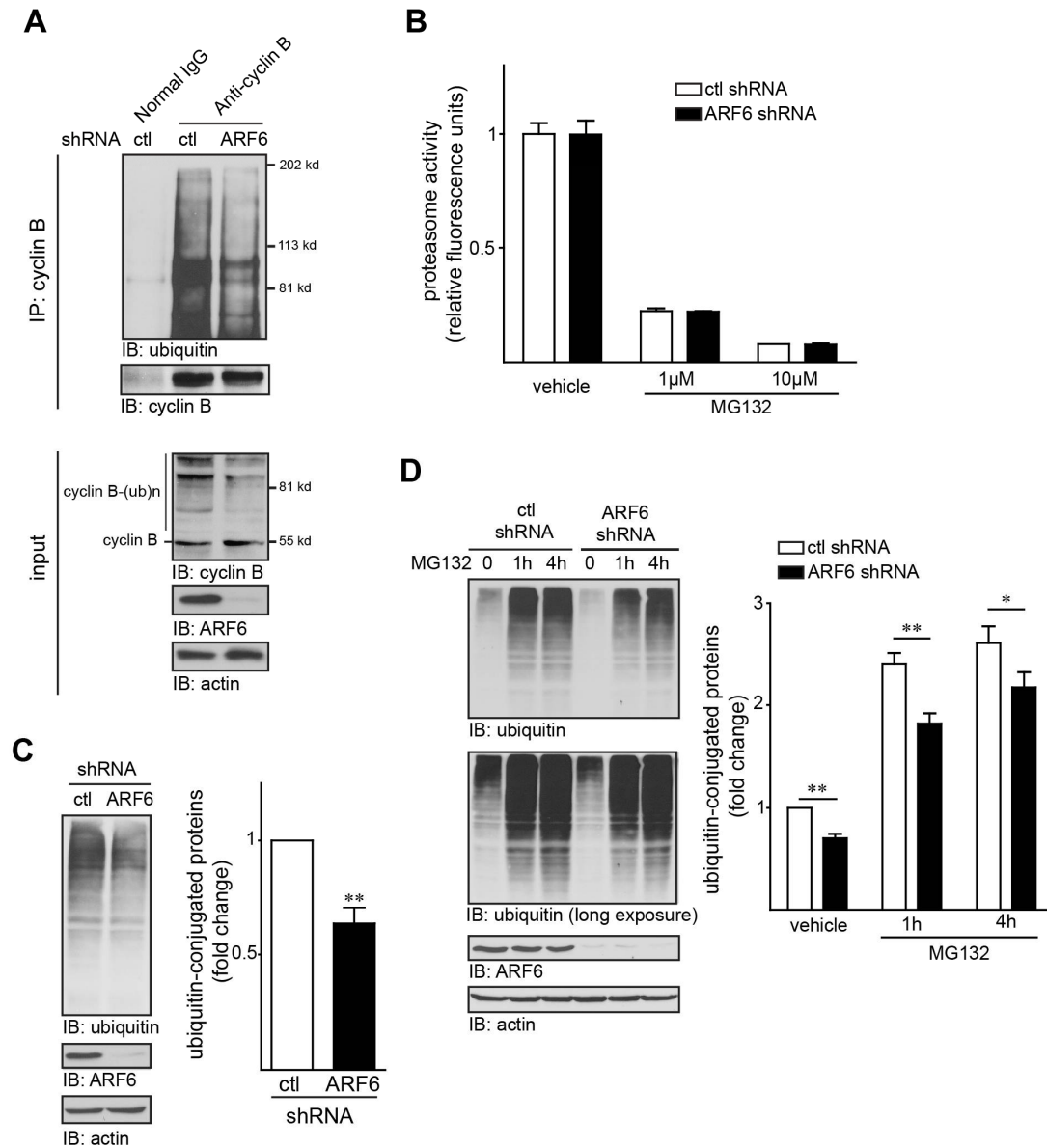


Figure 27. ARF6 depletion reduces cyclin B ubiquitination without affecting proteasome activity

Figure 5
Bourmoum et al.

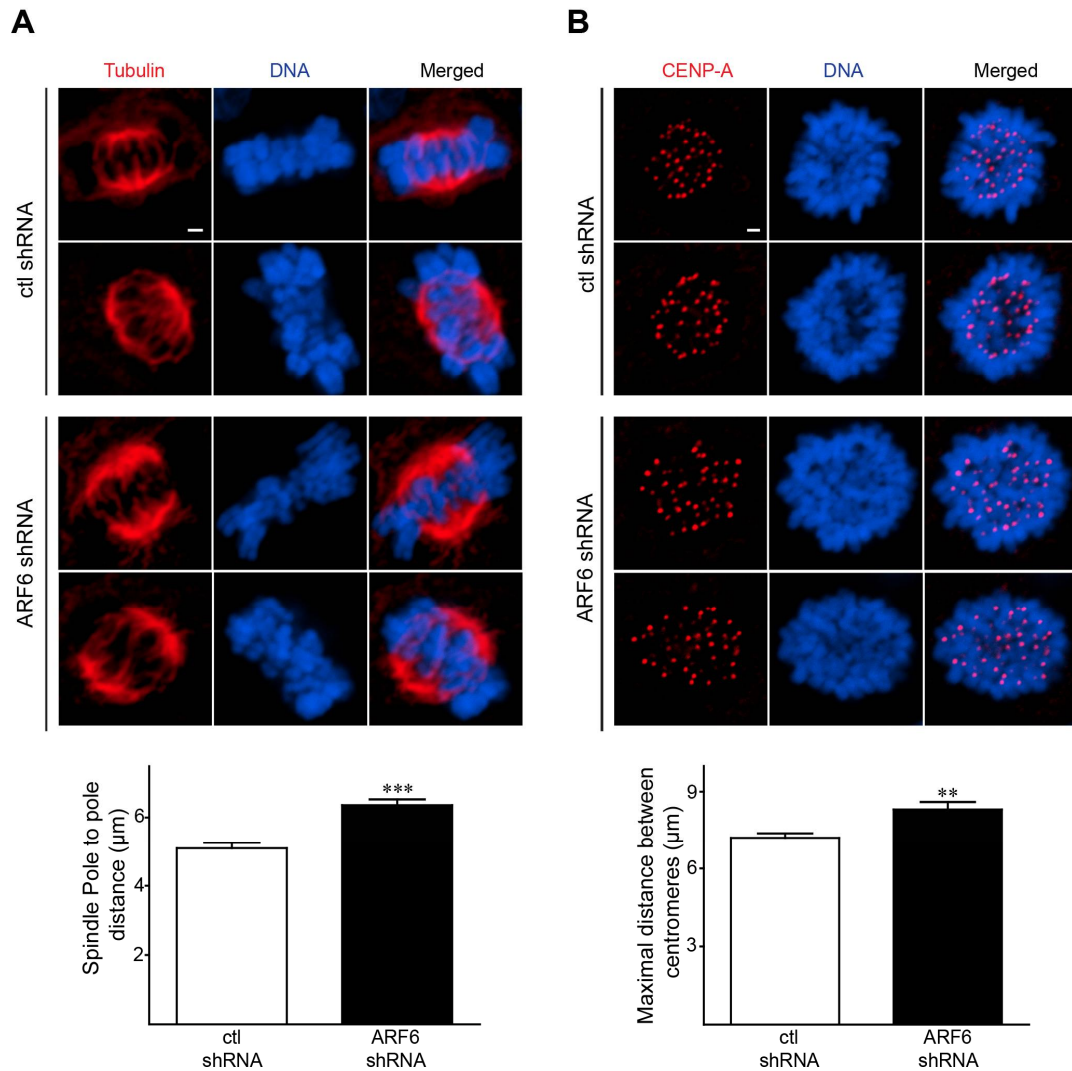


Figure 28. ARF6 depletion affects chromosomes positioning and attachments to microtubules at the metaphase plate

Figure 6
Bourmoum et al.

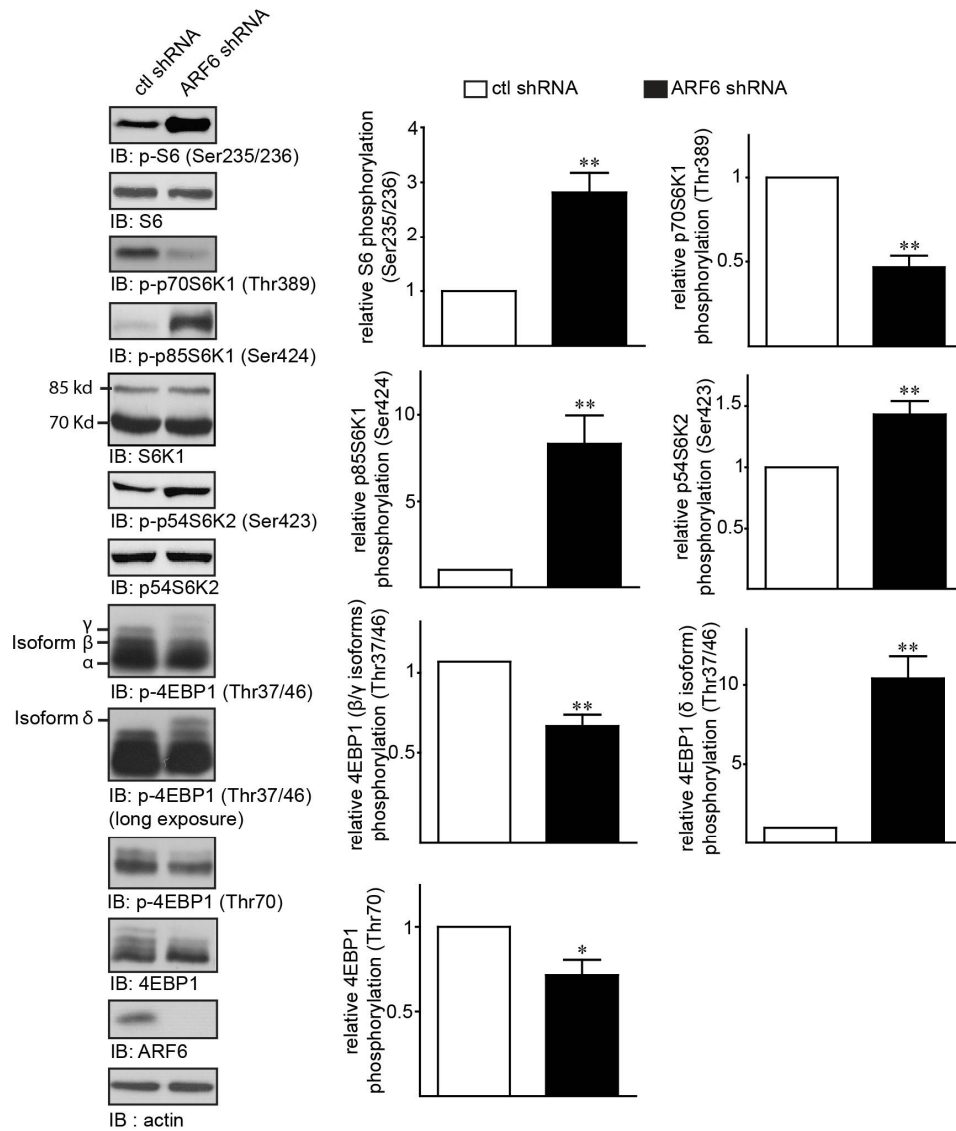


Figure 29. ARF6 depletion differently regulates mTOR pathway downstream components

Figure 7
Bourmoum et al.

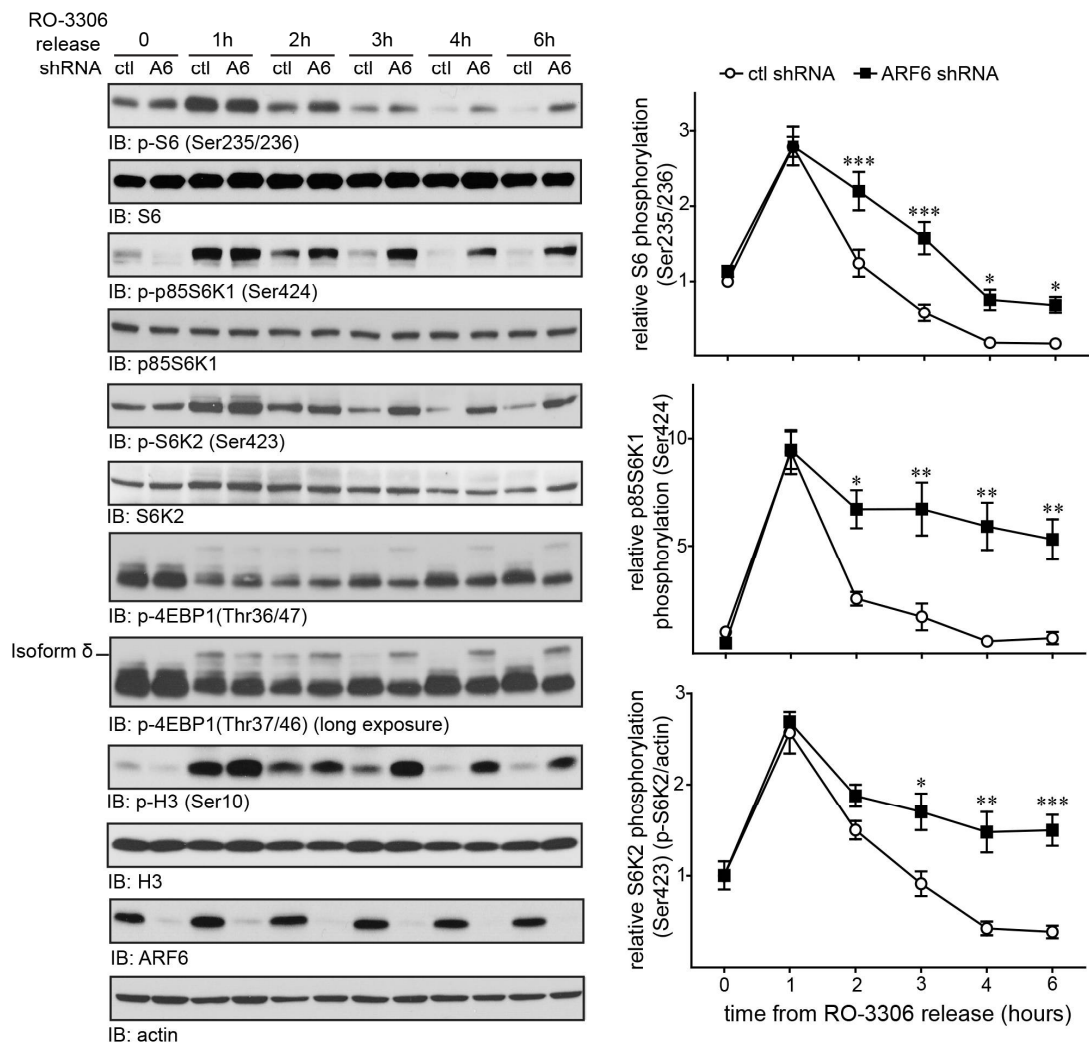


Figure 30. S6, p85S6K1 and p54S6K2 are activated during mitosis

Figure 8
Bourmoum et al.

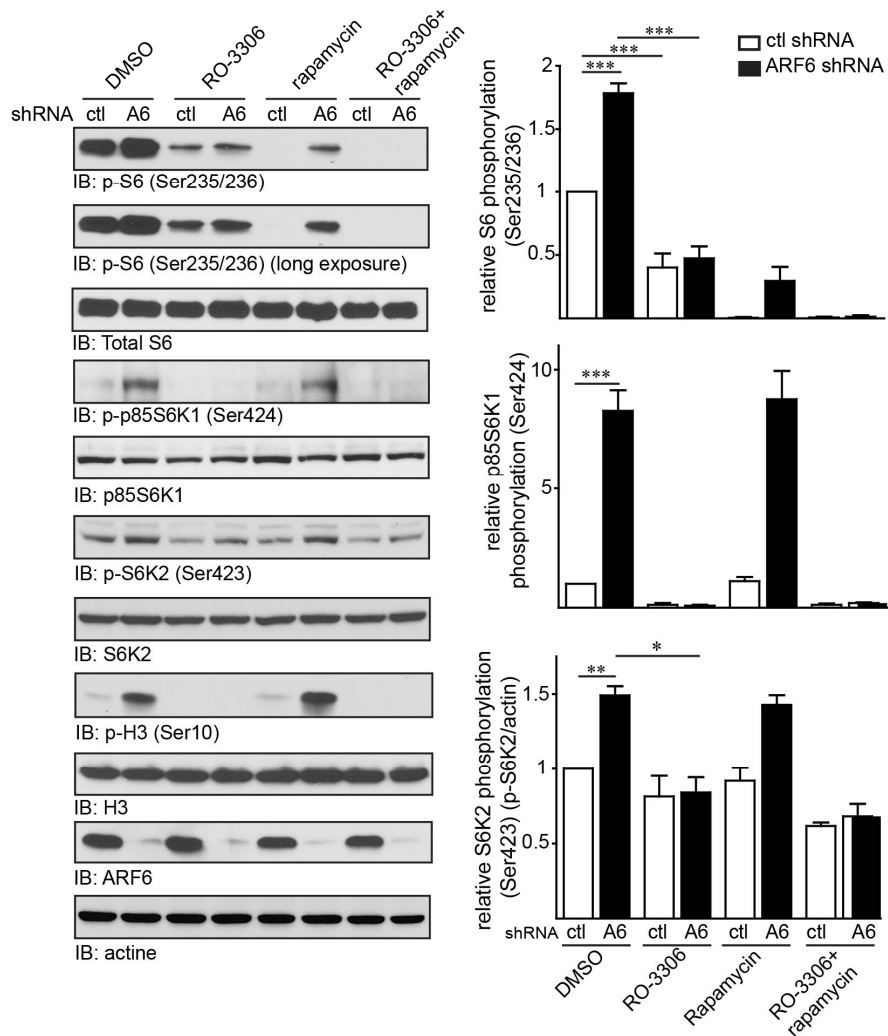


Figure 31. S6, p85S6K1 and p54S6K2 mitotic activation is CDK1-dependent

Figure S1
Bourmoum et al.

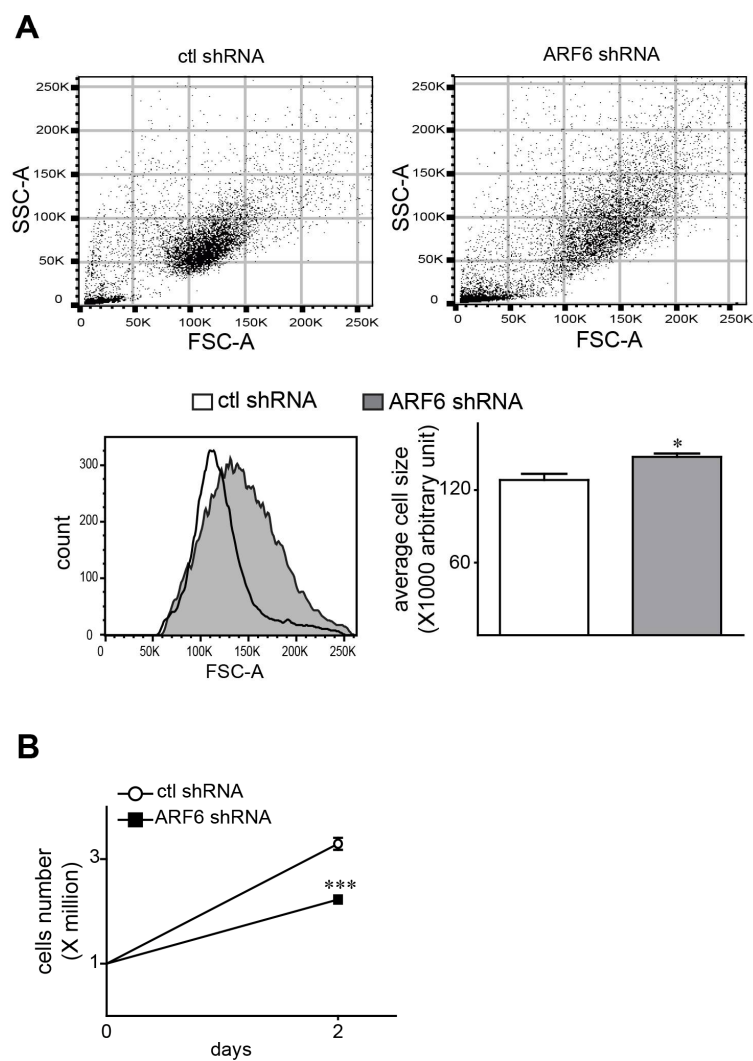


Figure 32. ARF6 depletion increases average cell size and decreases proliferation rate

Figure S2
Bourmoum et al.

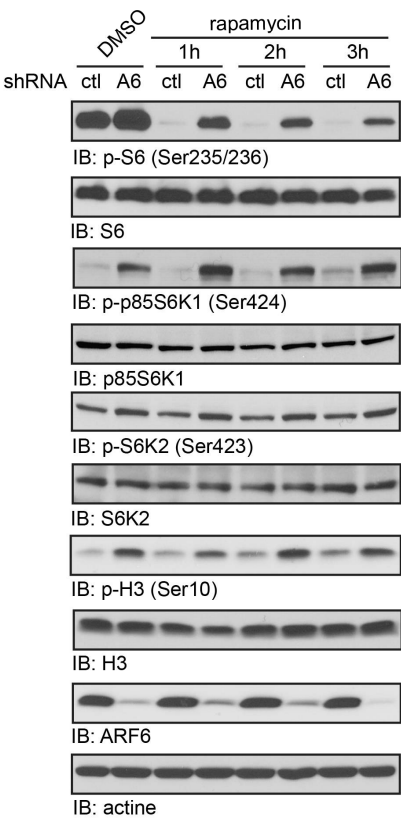


Figure 33. The implication of mTORC1 in S6, p85S6K1 and p54S6K2 activation

2.7. References

- Bourmoum, M., R. Charles and A. Claing (2016). "The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation." *PLoS One* 11(1): e0148097.
- Brown, H. A., S. Gutowski, C. R. Moomaw, C. Slaughter and P. C. Sternweis (1993). "ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity." *Cell* 75(6): 1137-1144.
- Buschhorn, B. A. and J.-M. Peters (2006). "How APC/C orders destruction." *Nat Cell Biol* 8(3): 209-211.
- Cai, S., C. B. O'Connell, A. Khodjakov and C. E. Walczak (2009). "Chromosome congression in the absence of kinetochore fibres." *Nat Cell Biol* 11(7): 832-838.
- Chang, D. C., N. Xu and K. Q. Luo (2003). "Degradation of Cyclin B Is Required for the Onset of Anaphase in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 278(39): 37865-37873.
- D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier (2006). "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 347-358.
- Daum, J. R., T. A. Potapova, S. Sivakumar, J. J. Daniel, J. N. Flynn, S. Rankin and G. J. Gorbsky (2011). "Cohesion Fatigue Induces Chromatid Separation in Cells Delayed at Metaphase." *Curr Biol* 21(12): 1018-1024.
- den Elzen, N. and J. Pines (2001). "Cyclin a Is Destroyed in Prometaphase and Can Delay Chromosome Alignment and Anaphase." *The Journal of Cell Biology* 153(1): 121-136.
- Fang, Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan and J. Chen (2001). "Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of mTOR Signaling." *Science* 294(5548): 1942-1945.
- Foley, E. A. and T. M. Kapoor (2013). "Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(1): 25-37.

Geley, S., E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J.-M. Peters and T. Hunt (2001). "Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome-Dependent Proteolysis of Human Cyclin a Starts at the Beginning of Mitosis and Is Not Subject to the Spindle Assembly Checkpoint." *The Journal of Cell Biology* 153(1): 137-148.

Grove, J. R., P. Banerjee, A. Balasubramanyam, P. J. Coffey, D. J. Price, J. Avruch and J. R. Woodgett (1991). "Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini." *Mol Cell Biol* 11(11): 5541-5550.

Kisselev, A. F. and A. L. Goldberg (2005). *Monitoring Activity and Inhibition of 26S Proteasomes with Fluorogenic Peptide Substrates. Methods in Enzymology*, Academic Press. Volume 398: 364-378.

Koh, H., K. Jee, B. Lee, J. Kim, D. Kim, Y. H. Yun, J. W. Kim, H. S. Choi and J. Chung (1999). "Cloning and characterization of a nuclear S6 kinase, S6 kinase-related kinase (SRK); a novel nuclear target of Akt." *Oncogene* 18(36): 5115-5119.

Lindqvist, A., V. Rodríguez-Bravo and R. H. Medema (2009). "The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network." *The Journal of cell biology* 185(2): 193-202.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(5): 307-318.

Magidson, V., C. B. O'Connell, J. Loncarek, R. Paul, A. Mogilner and A. Khodjakov (2011). "The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly." *Cell* 146(4): 555-567.

Makyio, H., M. Ohgi, T. Takei, S. Takahashi, H. Takatsu, Y. Katoh, A. Hanai, T. Ueda, Y. Kanaho, Y. Xie, H. W. Shin, H. Kamikubo, M. Kataoka, M. Kawasaki, R. Kato, S. Wakatsuki and K. Nakayama (2012). "Structural basis for Arf6-MKLP1 complex formation on the Flemming body responsible for cytokinesis." *The EMBO Journal* 31(11): 2590-2603.

Murray, A. W., M. J. Solomon and M. W. Kirschner (1989). "The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity." *Nature* 339(6222): 280.

Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 379-393.

Pesin, J. A. and T. L. Orr-Weaver (2008). "Regulation of APC/C Activators in Mitosis and Meiosis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 475-499.

Roux, P. P., D. Shahbazian, H. Vu, M. K. Holz, M. S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg and J. Blenis (2007). "RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation." *J Biol Chem* 282(19): 14056-14064.

Schweitzer, J. K., E. E. Burke, H. V. Goodson and C. D'Souza-Schorey (2005). "Endocytosis Resumes during Late Mitosis and Is Required for Cytokinesis." *Journal of Biological Chemistry* 280(50): 41628-41635.

Shah, O. J., S. Ghosh and T. Hunter (2003). "Mitotic Regulation of Ribosomal S6 Kinase 1 Involves Ser/Thr, Pro Phosphorylation of Consensus and Non-consensus Sites by Cdc2." *Journal of Biological Chemistry* 278(18): 16433-16442.

Shuda, M., C. Velasquez, E. Cheng, D. G. Cordek, H. J. Kwun, Y. Chang and P. S. Moore (2015). "CDK1 substitutes for mTOR kinase to activate mitotic cap-dependent protein translation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(19): 5875-5882.

Stevens, D., R. Gassmann, K. Oegema and A. Desai (2011). "Uncoordinated loss of chromatid cohesion is a common outcome of extended metaphase arrest." *PLoS One* 6(8): e22969.

Steward, D. L., J. R. Shaeffer and R. M. Humphrey (1968). "Breakdown and Assembly of Polyribosomes in Synchronized Chinese Hamster Cells." *Science* 161(3843): 791-793.

Discussion

La GTPase ARF6 est principalement connue pour son rôle dans l'endocytose, le trafic membrane plasmique-endosomes et le remodelage de l'actine en périphérie cellulaire (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006, Sabe, Hashimoto et al. 2009). De plus, ARF6 a été bien caractérisée comme étant un acteur principal dans la migration cellulaire (Santy and Casanova 2001, Charles, Namkung et al. 2016) et l'invasion tumorale (Hashimoto, Onodera et al. 2004, Tague, Muralidharan et al. 2004). Dans cette étude, nous démontrons qu'ARF6 contrôle également la prolifération cellulaire en agissant à deux niveaux éloignés du cycle cellulaire soit le début de la phase G₁ et la mitose. Le rôle d'ARF6 dans les premières voies promotrices de la prolifération se produisant en phase G₁ a été étudié (**chapitre 1**) dans le contexte cardiovasculaire en utilisant des cellules musculaires lisses vasculaires comme modèle cellulaire et l'angiotensine II comme agent pro prolifératif. La voie de signalisation de l'AngII dans ce modèle a été largement étudiée et caractérisée (Mehta and Griendling 2007), ce qui nous a permis de bien vérifier notre hypothèse. En effet, nos résultats montrent qu'ARF6 contrôle la production des ROS induite par l'AngII en régulant positivement l'activation de la GTPase Rac1 et l'expression de la NADPHoxydase NOX1. Les ROS agissent comme médiateurs pour favoriser la transactivation de l'EGFR et l'activation des MAP Kinases ERK1/2, p38MAPK et JNK1/2 induisant l'expression des gènes nécessaires à la transition G₁/S. Ainsi, durant les premières minutes d'un stimulus prolifératif, ARF6, via son contrôle de la production des ROS et l'activation des MAPKinases, joue un rôle déterminant dans la décision de la cellule à s'engager dans un cycle cellulaire et à proliférer. De plus, nous montrons qu'ARF6 est nécessaire pour la dernière phase du cycle cellulaire, la mitose. Nos expériences (**chapitre 2**) effectuées dans des cellules HEK293 révèlent que la GTPase ARF6 est important pour la transition métaphase/anaphase. Nous avons montré qu'ARF6 joue un rôle dans la stabilité des fibres-K et l'organisation des chromosomes au niveau de la plaque de métaphase, permettant ensuite l'inactivation du SAC, l'ubiquitination et la dégradation de la cycline B et la ségrégation chromosomique (l'anaphase). Finalement, en étudiant les composantes de la voie mTOR dans des cellules déplétées en ARF6, nous avons identifié

l'activation de la protéine ribosomale S6 par les kinases p85S6K1 et S6K2 comme étant un événement mitotique dépendant de CDK1.

Bien que l'activation de la GTPase Rac1 par l'AngII dans les CMLVs ait été bien identifiée depuis longtemps (Schmitz, Thömmes et al. 2001), les médiateurs en amont de Rac1 ont été moins caractérisés. Ici, nous rapportons que l'activation de cette GTPase induite par l'AngII est sous le contrôle d'ARF6. De multiples études ont précédemment montré une coordination entre ces deux GTPases dans différents modèles cellulaires (D'Souza-Schorey, Boshans et al. 1997, Santy and Casanova 2001, Albertinazzi, Za et al. 2003, Palacios and D'Souza-Schorey 2003). Dans ce contexte, plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés. En effet, Santy et ses collègues ont rapporté qu'ARF6 contrôle l'activité de Rac1 par la régulation du complexe Dock180/Elmo dans des cellules MDCK (Santy, Ravichandran et al. 2005). De plus, l'activation d'ARF6 recrute l'ARFGAP, GIT1/2 qui, à son tour, recrute le RacGEF, β -PIX (Di Cesare, Paris et al. 2000, Zhao, Manser et al. 2000). Aussi, ARF6 pourrait réguler le ciblage membranaire de Rac1 nécessaire à son activation (Radhakrishna, Al-Awar et al. 1999, Zhang, Calafat et al. 1999). Le lien entre ARF6 et Rac1 a été donc largement étudié dans les processus de la migration et l'adhésion cellulaires comme mentionné ci-haut. Notre étude met en évidence une coordination entre ces deux GTPases dans un nouveau contexte, celui de la prolifération cellulaire. En effet, outre son rôle dans la migration et le remodelage de l'actine, Rac1 pourrait promouvoir la prolifération dans plusieurs lignées cellulaires (Minden, Lin et al. 1995, MOORE, SETHI et al. 1997, Burstein, Hesterberg et al. 1998, Ma, Xue et al. 2013), y compris les cellules musculaires lisses vasculaires (Page, Li et al. 1999). Il est donc normal qu'ARF6 contrôle la prolifération des CMLVs étant donné qu'elle régule l'activation de Rac1 en réponse à l'AngII. Cependant, le rôle d'ARF6 dans la prolifération induite par l'AngII ne peut pas être totalement attribuable à son effet sur Rac1 puisque les voies de signalisation empruntées en aval ne sont pas forcément les mêmes. Effectivement, nos résultats (**chapitre 1**) montrent qu'ARF6 agit comme médiateur pour l'activation des trois MAPKinases ERK1/2, p38MAPK et JNK1/2 alors que Rac1 promeut l'activation de JNK1/2 et p38MAPK mais pas ERK1/2 (Minden, Lin et al. 1995). Nous avons démontré que, dans notre modèle cellulaire, l'activation de Rac1 induite par l'AngII est totalement dépendante d'ARF6. Il serait intéressant de refaire ces expériences avec d'autres agonistes des récepteurs

RCPGs comme l'endothéline-1 et également avec des facteurs de croissance tels que l'EGF et le PDGF. Ainsi, en comparant les résultats des différents agonistes, on pourrait mieux comprendre les mécanismes impliquant la régulation de l'activité de Rac1 par ARF6.

La GTPase ARF6 est nécessaire pour la transition métaphase/anaphase durant la mitose (**chapitre 2**) et nos résultats montrent que la déplétion d'ARF6 diminue la stabilité des microtubules (fibres-K) et l'organisation des chromosomes au niveau de la plaque de métaphase, ce qui bloque les cellules à cette phase de la mitose. Curieusement, Rac1 pourrait activer PAK1 pour phosphoryler et inactiver OP18/stathmin qui déstabilise les extrémités (+) des microtubules (Wittmann, Bokoch et al. 2004). Il est donc possible qu'ARF6 contrôle la stabilité des fibres-K via Rac1. Cependant, cette étude (Wittmann, Bokoch et al. 2004) a été réalisée dans le contexte de la migration cellulaire et d'autres études ont indiqué que Rac1 ne joue aucun rôle dans la métaphase et l'entrée en anaphase (Yasuda, Ocegüera-Yanez et al. 2004).

Notre étude révèle un lien complètement inconnu entre ARF6 et les ROS dans les CMLVs. Nous avons démontré qu'ARF6 contrôle aussi bien la production basale des ROS que celle induite par l'AngII par deux mécanismes différents, la régulation de l'activité de Rac1 et le contrôle de l'expression de NOX1. Le recrutement de Rac1 aux complexes NOX1, NOX2 et NOX3 est nécessaire à la production des ROS (Hordijk 2006) et pourrait expliquer en grande partie le rôle d'ARF6 dans la production des ROS dépendante de l'AngII étant donné qu'ARF6 contrôle l'activité de Rac1. La production des ROS induite par l'AngII est principalement médiée par NOX1 (Lassegue, Sorescu et al. 2001) et elle se produit essentiellement dans les compartiments membranaires riches en radeaux lipidiques/caveolae. Effectivement, il a été démontré que, suite à la stimulation par l'AngII, la cavéoline 1 (Cav1) induit le ciblage du récepteur AT1 aux radeaux lipidiques enrichis en Cav1, sa liaison avec NOX1 et l'activation subséquente de Rac1 permettant la production des ROS (Zuo, Ushio-Fukai et al. 2004, Zuo, Ushio-Fukai et al. 2005, Valente, Yoshida et al. 2012). Comme ARF6 joue un rôle primordial dans le trafic membrane plasmique-endosomes, il est très probable que le ciblage du récepteur AT1 aux radeaux lipidiques pour activer NOX1 se fait par la voie des endosomes qui est ARF6-dépendante (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006), ce qui justifierait le rôle d'ARF6 dans la production des ROS induite par l'AngII. Dans ce même contexte, une éventuelle

interaction entre ARF6 et Cav1 est à explorer dans notre modèle. Ainsi, Cav1 pourrait faire le lien entre ARF6 et Rac1. Dans la même étude citée en haut (Zuo, Ushio-Fukai et al. 2005), il a été montré que la transactivation de l'EGFR par l'AT1 se produit également dans les radeaux lipidiques enrichis en Cav1. De plus, celle-ci est médiée par les ROS, ce qui supporte notre modèle montrant qu'ARF6 contrôle la transactivation de l'EGFR induite par l'AT1 via les ROS. Les cellules musculaires lisses vasculaires de l'aorte expriment principalement deux types de NOXs, NOX1 et NOX4 (Clemens and Griendling 2006). Nos résultats montrent que l'expression de NOX1 est positivement régulée par ARF6 mais pas celle de NOX4. La diminution du niveau protéique de NOX1 dans les cellules déplétées en ARF6 justifie la diminution du niveau basal des ROS puisque la déplétion d'ARF6 n'affecte pas l'activité basale de Rac1. Les NADPH oxydases NOX1 et NOX4 ont très peu en commun. Dans les CMLVs, NOX1 est localisée principalement aux radeaux lipidiques enrichis en Cav1 tandis que NOX4 se localise au niveau des adhérences focales (Hilenski, Clemens et al. 2004). De plus, les deux isoformes ont des fonctions distinctes et leurs expressions sont régulées différemment. NOX1 a une activité mitogène et favorise la prolifération cellulaire (Suh, Arnold et al. 1999), tandis que NOX4 est impliquée dans la sénescence (Geiszt, Kopp et al. 2000). Dans les CMLVs, NOX1 est inductible et régulée positivement par les facteurs de croissance ainsi que l'AngII, contrairement à NOX4 qui est régulée négativement par ces agonistes (Lassegue, Sorescu et al. 2001). L'effet d'ARF6 sur la régulation de l'expression de NOX1 est donc spécifique et indépendant de la voie de régulation de NOX4, ce qui confirme que l'effet d'ARF6 sur la prolifération cellulaire implique les ROS produits par NOX1. Cependant, les mécanismes par lesquels ARF6 régule l'expression de NOX1 restent à déterminer. Il a été précédemment rapporté que l'expression de NOX1 est sous le contrôle des facteurs de transcription GATA-4, -5 et -6 dans les cellules épithéliales du côlon (Brewer, Sparks et al. 2006). Parallèlement, GATA-6 est un régulateur clé de l'expression des gènes dans les CMLVs (Lepore, Cappola et al. 2005). ARF6 pourrait donc réguler l'expression de Nox1 dans les CMLVs via GATA-6.

La transactivation de l'EGFR joue un rôle important dans la signalisation de l'AngII. Dans les CMLVs, ce processus implique l'activation des métalloprotéases 2/9 et Src (Kim, Ahn et al. 2009). Nos résultats démontrent qu'ARF6 est nécessaire pour la transactivation de l'EGFR induite par l'Ang II puisque la déplétion de cette GTPase prévient la phosphorylation

des résidus Tyr1086 et Tyr845 de ce récepteur. Bien qu'il ait été proposé que la transactivation de l'EGFR se produise en amont de la production des ROS (Seshiah, Weber et al. 2002), plusieurs évidences démontrent que la transactivation de l'EGFR par l'AngII nécessite aussi les ROS (Mifune, Ohtsu et al. 2005). En effet, nous montrons que l'inhibiteur spécifique de NOX1, ML171 et l'inhibiteur à large spectre des NOXs, DPI sont capables de prévenir cette transactivation. Cependant, nos résultats n'excluent pas la possibilité que la transactivation de l'EGFR via ROS puisse conduire à un deuxième épisode de production des ROS médié par l'EGFR. Cette hypothèse pourrait expliquer la deuxième montée de la production des ROS (à partir de 30 min de stimulation par l'AngII) observée dans nos expériences.

De plus, nous avons prouvé que l'activation des MAP Kinases ERK1/2, p38MAPK et JNK1/2 induite par l'AngII était complètement dépendante d'ARF6. Bien que la sensibilité de p38MAPK et JNK1/2 aux ROS ait été largement documentée (Ushio-Fukai, Alexander et al. 1998, Viedt, Soto et al. 2000, Kyaw, Yoshizumi et al. 2001, Wang, Castresana et al. 2004), le lien entre ERK1/2 et ROS demeure controversé (Frank, Eguchi et al. 2000, Viedt, Soto et al. 2000, Kyaw, Yoshizumi et al. 2001, Touyz, Cruzado et al. 2003, Pinzar, Wang et al. 2005). Il est clair que dans notre modèle, l'activation des trois MAP Kinases ERK1/2, p38MAPK et JNK1/2 est dépendante des ROS puisque elle est sensible à l'inhibiteur spécifique de NOX1, ML171 et l'inhibiteur à large spectre des NOXs, DPI. L'AngII stimule l'activation des trois MAP Kinases mais leur contribution à la prolifération des CMLVs peut être questionnée. Parmi les trois, la voie ERK1/2 est la plus associée avec la prolifération cellulaire et son activation est nécessaire à la transition G₁/S du cycle cellulaire (Meloche and Pouyssegur 2007). Contrairement, p38MAPK a été mieux caractérisé dans la migration cellulaire, la différenciation (Cuenda and Rousseau 2007), les réponses immunitaires et l'inflammation (Raingeaud, Gupta et al. 1995). Le rôle de p38MAPK dans la prolifération cellulaire est controversé et parfois contradictoire dépendamment du type cellulaire et du stimulus. En effet, la p38MAPK peut réguler négativement la progression du cycle cellulaire à deux niveaux: la transition G₁/S (Pillai, Sapna et al. 2011) et G₂/M (Takenaka, Moriguchi et al. 1998), mais peut aussi induire la prolifération dans certaines types cellulaires (Crawley, Rawlinson et al. 1997, Chen, Mayer et al. 2009). Finalement, JNK1/2 est un médiateur positif de la prolifération cellulaire qui favorise l'activation de c-Jun et la formation du complexe AP-1

induisant la transcription des gènes nécessaires à la transition G₁/S (Jaeschke, Karasarides et al. 2006). Aussi, JNK1/2 joue un rôle important dans la migration cellulaire (Huang, Rajfur et al. 2003) et la réponse apoptotique aux stress cellulaires (Dhanasekaran and Reddy 2008). Dans le but de spécifier la/les voie(s) des MAP Kinases promotrice(s) de la prolifération dans notre modèle, il serait nécessaire d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces voies. Cependant, les résultats de l'inhibition spécifique d'une voie MAP Kinase doivent être interprétés avec précaution car il est bien établi que les trois voies ERK1/2, p38MAPK et JNK1/2 interfèrent et communiquent pour coordonner différentes réponses cellulaires (Zhang and Liu 2002). Par conséquent, l'inhibition d'une voie donnée peut résulter en un effet compensatoire par une autre voie MAP Kinase. De plus, il est connu que la stimulation des CMLVs par l'AngII, induit conjointement une réponse proliférative et migratoire. Ainsi, la prolifération et la migration des CMLVs sont deux phénomènes possiblement inséparables. En accord avec cela, notre équipe a montré qu'en réponse à l'AngII, ARF6 est aussi bien nécessaire pour la prolifération (cette étude) que pour la migration cellulaire (Charles, Namkung et al. 2016).

Ensemble, tous ces résultats confirment qu'ARF6 joue un rôle de médiateur pour promouvoir la prolifération des CMLVs induite par l'AngII principalement via les ROS qui permettent la transactivation de l'EGFR et l'activation des MAP Kinases. Ces dernières activent l'expression des gènes nécessaires à la transition G₁/S et l'engagement dans le cycle cellulaire. Ce rôle d'ARF6 comme intermédiaire de la signalisation de l'AngII pourrait être indépendant de son rôle classique comme régulateur de l'endocytose. Cependant, il est possible que cette GTPase puisse promouvoir la signalisation de l'AngII en favorisant l'endocytose de l'AT1 et son ciblage dans des endosomes vers les radeaux lipidiques enrichis en Cavéoline 1 où il s'associe avec NOX1 et recrute Rac1 permettant la production des ROS, qui agissant comme médiateurs pour la transactivation de l'EGFR et l'activation des MAP Kinases.

Outre son rôle dans les premières voies de signalisation promotrices de la prolifération, nous montrons qu'ARF6 joue également un rôle dans la transition métaphase/anaphase et la progression mitotique (**chapitre 2**). Pour étudier le rôle de la GTPase ARF6 dans la mitose, nous avons utilisé une autre lignée cellulaire, les HEK293. Contrairement à la première partie (**chapitre 1**), les cellules étaient maintenues dans un milieu complet contenant du sérum sans

stimulation avec un agoniste spécifique. Il a été suggéré qu'ARF6 est impliquée dans la mitose mais seulement dans les dernières étapes juste avant la séparation des cellules filles. En effet, il a été démontré qu'ARF6 se localise dans le corps médian (midbody) formé entre les cellules filles à la fin de la télophase où elle favorise l'achèvement de la cytokinèse via son interaction avec la protéine MKLP1 (Mitotic Kinesin-Like Protein 1) (Makyio, Ohgi et al. 2012). D'autres études ont proposé que le rôle d'ARF6 dans l'achèvement de la cytokinèse est dû à sa régulation du trafic membrane plasmique-endosomes (Schweitzer, Burke et al. 2005). De plus, il a été montré qu'ARF6 prévenait la désintégration prématurée du corps médian (Joseph, Hutterer et al. 2012). Malgré toute cette attention portée sur le rôle mitotique d'ARF6, aucune étude n'a réussi à identifier ce que nous démontrons ici, soit le rôle d'ARF6 dans la transition métaphase/anaphase. Par comparaison avec les études précédentes, nous avons identifié deux principales différences. Toutes ces études ont concentré leurs expériences spécifiquement sur la cytokinèse en se basant sur les premières observations qui montraient un enrichissement d'ARF6 au niveau du scion du clivage (cleavage furrow) et du corps médian (midbody) (Schweitzer and D'Souza-Schorey 2002). La deuxième différence consiste en l'approche expérimentale utilisée. La plupart de ces études ont utilisé soit des techniques d'interférences d'ARN moins efficaces (50-70%) (Schweitzer, Burke et al. 2005) ou des approches de surexpression de mutants d'ARF6 ou des formes d'ARF6 fusionnées avec des protéines fluorescentes (Makyio, Ohgi et al. 2012). En revanche, notre étude se distingue par une grande efficacité de déplétion d'ARF6 (> 95%) et l'utilisation de la microscopie à fluorescence des cellules vivantes.

Ce n'est pas la première fois qu'une protéine impliquée dans l'endocytose s'avère importante pour la mitose. La clathrine est connu pour son rôle dans la stabilisation des microtubules du fuseau mitotique pour faciliter la congression des chromosomes (Royle, Bright et al. 2005). Aussi, la dynamine 2 est associée aux centrosomes et elle est essentielle pour maintenir la cohésion de ces derniers (Thompson, Cao et al. 2004). De plus, la GTPase Rab6A' joue un rôle dans l'inactivation du système de surveillance SAC permettant la transition métaphase/anaphase (Miserey-Lenkei, Couédel-Courteille et al. 2006). Curieusement, pendant la mitose, ces protéines endocytaires semblent avoir des fonctions distinctes de leur principale fonction dans le trafic membranaire pendant l'interphase. En

mitose, ces protéines ne semblent pas être connectées aux membranes et elles interagissent avec d'autres partenaires différents de ceux impliqués dans le trafic membranaire (Thompson, Cao et al. 2004, Royle, Bright et al. 2005, Miserey-Lenkei, Couédel-Courteille et al. 2006). Basé sur toutes ces évidences, nous proposons que le rôle d'ARF6 dans la transition métaphase/anaphase est distinct de sa fonction dans l'endocytose.

Nos résultats indiquent que les premières étapes de la mitose ne requièrent pas ARF6 puisque l'entrée en mitose et la congression des chromosomes se font normalement dans les cellules déplétées de cette ARF. L'ancien modèle de la congression des chromosomes proposait que cette dernière est le résultat de la formation des attachements bi-orientés entre les kinétochores sœurs et les fibres K (McEwen, Heagle et al. 1997). Ce modèle a été réévalué et il est bien établi maintenant que la congression chromosomique peut avoir lieu avec des attachements latéraux des chromosomes aux microtubules indépendamment de la bi-orientation et que les attachements bi-orientés sont établis à la plaque de métaphase quand l'attachement latéral est converti en attachement terminal (Cai, O'Connell et al. 2009, Magidson, O'Connell et al. 2011). Nos résultats sont en accord avec ce modèle puisque la déplétion d'ARF6 n'affecte pas le processus de congression des chromosomes. Néanmoins, elle altère la stabilité des Fibres-K et l'architecture des chromosomes à la plaque de métaphase suggérant un défaut de l'établissement des attachements bi-orientés. Nous proposons donc qu'ARF6 est nécessaire à la conversion des attachements latéraux en attachements terminaux une fois que les chromosomes rejoignent la plaque de métaphase.

L'activité mitotique de CDK1 dépend de ses partenaires activateurs, la cycline A et B. Contrairement à la cycline B qui est exclusivement mitotique, la cycline A peut lier à la fois CDK1 (en mitose) et CDK2 (en phase S). Nous montrons que la dégradation de la cycline A pendant la mitose se fait normalement dans les cellules déplétées en ARF6 contrairement à celle de la cycline B qui est bloquée. Il est bien connu qu'en dépit d'être les substrats de la même enzyme (l'ubiquitine ligase E3), la régulation et le timing de la dégradation de ces deux cyclines sont différents. En effet, la dégradation de la cycline A commence tôt et se termine avant celle de la cycline B (Whitfield, Gonzalez et al. 1990, Geley, Kramer et al. 2001). De plus, l'activation du système de surveillance SAC stabilise la cycline B, mais pas la cycline A (Hunt, Luca et al. 1992). Il a été également rapporté que la dégradation de la cycline A est

nécessaire pour la stabilisation des attachements kinétochore-microtubule (Kabeche and Compton 2013). Dans notre étude, il est clair que l'instabilité des fibres-K, qu'on a observé dans les cellules déplétées en ARF6, n'est pas due à un défaut de dégradation de la cycline A, puisque cette dernière se produisait normalement comparativement aux cellules contrôles. Il est important de souligner que la dégradation de la cycline A dans nos expériences ne commençait pas aussi tôt que précédemment décrit (den Elzen and Pines 2001); ceci pouvant être justifié par les différences entre les lignées cellulaires.

En revanche, la dégradation de la cycline B est déclenchée à la fin de la métaphase et elle est associée avec la transition métaphase/anaphase. La forme non dégradable de la cycline B pourrait bloquer l'entrée en anaphase (Chang, Xu et al. 2003). Nos résultats indiquent que la déplétion d'ARF6 bloque la dégradation de la cycline B sans affecter la machinerie de dégradation protéique, les protéasomes. Pour être dégradée par les protéasomes, la cycline B doit être préalablement ubiquitinée par l'ubiquitine ligase E3, APC/C^{Cdc20}, ce qui nécessite que le système de surveillance SAC soit comblé et inactivé. Le système SAC exige que tous les chromosomes au niveau de la plaque de métaphase établissent des attachements kinétochore-microtubule bi-orientés (Musacchio and Salmon 2007, Pesin and Orr-Weaver 2008). Nous proposons qu'ARF6 est nécessaire à l'établissement de ces attachements bi-orientés lors de la métaphase. En l'absence d'ARF6, ces attachements sont altérés et le système SAC reste actif, ce qui empêche l'ubiquitination de la cycline B, donc sa dégradation. Ainsi, les cellules déplétées en ARF6 restent bloquées à la métaphase (**Fig 34**). Il serait intéressant de confirmer l'implication du SAC dans ce blocage à la métaphase. On pourrait simplement inhiber le SAC et voir si les cellules seraient capables de surmonter la phase de métaphase et entrer en anaphase. Basé sur nos résultats, nous assumons que la non ubiquitination de la cycline B est le résultat de l'activation du SAC puisque les attachements entre les microtubules et les chromosomes sont altérés. Bizarrement, on a trouvé que l'ubiquitination totale est réduite dans les cellules déplétées en ARF6. Ceci peut suggérer un défaut dans le processus global d'ubiquitination mais pourrait aussi être une conséquence de l'effet de la déplétion d'ARF6 sur le cycle cellulaire (plus de cellules en mitose et moins de cellules en phase G₁) étant donné que l'ubiquitination orchestrée par l'APC/C^{Cdc20} et l'APC/C^{Cdh1} est connue pour augmenter à la fin de la mitose et au début de la phase G₁ (Buschhorn and Peters 2006) et que les cellules

déplétées en ARF6 sont incapables d'atteindre ces stades. L'inactivation du SAC active donc l'ubiquitine ligase E3, APC/C^{Cdc20}, mais l'ubiquitination pourrait également jouer un rôle dans l'inactivation du SAC. En effet, l'ubiquitine ligase E3, CUL3 liant la protéine adaptatrice KLHL22 (CUL3-KLHL22), catalyse l'ubiquitination du résidu Lys492 situé dans le domaine PBD de PLK1 permettant sa dissociation des kinétochores et l'inactivation du SAC (Beck, Maerki et al. 2013). De plus, Aurora B localisée aux centromères est connue pour recruter les protéines du SAC au niveau des kinétochores (Kelly and Funabiki 2009). L'ubiquitination d'Aurora B par CUL3-KLHL9/KLHL13 est nécessaire pour sa dissociation des centromères et l'inactivation du système SAC (Sumara, Quadroni et al. 2007). Donc, un défaut d'ubiquitination d'Aurora B ou de la PLK1 à la fin de la métaphase pourrait maintenir le SAC actif et empêcher la transition métaphase/anaphase. Nous avons évalué l'ubiquitination de PLK1 et d'Aurora B à la fin de la métaphase (résultats non montrés) et nous n'avons constaté aucune différence entre les cellules contrôles et les cellules déplétées en ARF6, ce qui supporte notre modèle suggérant que l'inhibition de l'ubiquitination de la cycline B est la conséquence de l'activation du SAC qui est causée par un défaut d'attachements kinétochore-microtubule dans les cellules déplétées en ARF6. La diminution de l'ubiquitination totale dans ces cellules reste donc à expliquer. Pour ceci, on pourrait synchroniser les cellules contrôles et déplétées en ARF6, puis les libérer dans un milieu contenant du MG132 (inhibiteur des protéasomes). En évaluant les protéines ubiquitinées accumulées (par Western blot) au cours du temps (15, 30, 45 et 60 min), il serait possible de mesurer la vitesse de l'ubiquitination totale dans ces cellules.

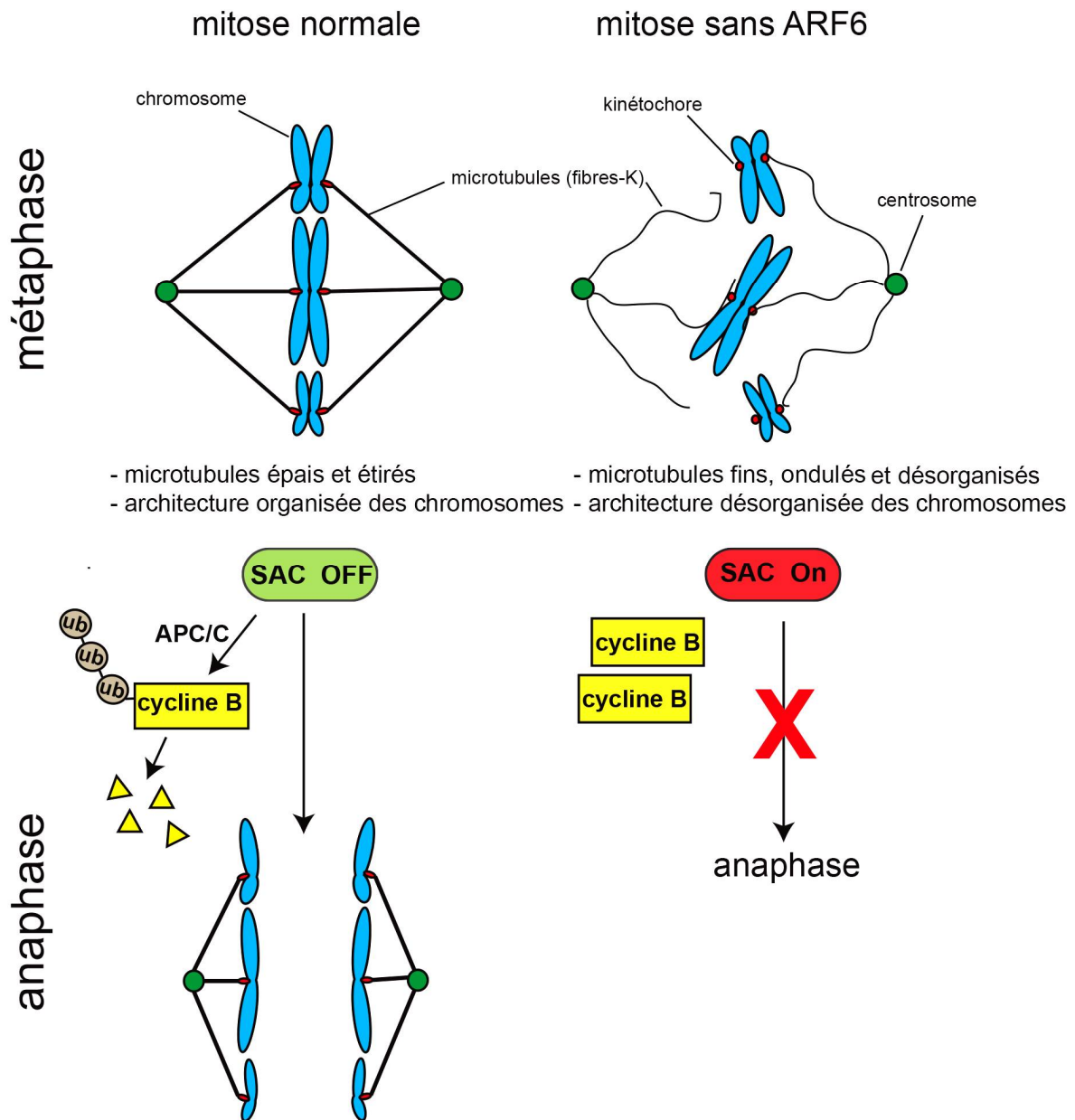


Figure 34. Modèle du rôle d'ARF6 dans la mitose

En conditions normales, les chromosomes s'alignent d'une manière très organisée au niveau de la plaque de métaphase grâce aux attachements bi-orientés aux fibres-K. Ces derniers sont stables, épais et bien étirés. Une fois que tous les chromosomes sont correctement attachés, SAC est inactivé, ce qui déclenche l'ubiquitination de la cycline B, sa dégradation et l'anaphase. En l'absence d'ARF6, l'architecture des chromosomes au niveau de la plaque de métaphase est désorganisée, les microtubules sont instables, fins et ondulés et les attachements latéraux ainsi que les kinétochores non attachés sont fréquents. Ceci maintient le système SAC actif, les niveaux de la cycline B restent élevés et la transition métaphase/anaphase est bloquée.

Nous proposons qu'ARF6 joue un rôle dans l'établissement des attachements bi-orientés entre les kinétochores sœurs et les fibres K (les faisceaux de microtubules) lors de la métaphase. Néanmoins, nous n'avons pas identifié le mécanisme par lequel ARF6 pourrait réguler ces attachements. Il est accepté que l'établissement de ces attachements et leur stabilisation dépendent essentiellement de l'équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation des substrats situés aux kinétochores, aux centromères et aux extrémités (+) des microtubules. La phosphorylation joue un rôle déstabilisateur tandis que la déphosphorylation permet de stabiliser ces attachements (Godek, Kabeche et al. 2015). En progressant vers la métaphase, la kinase Aurora B s'enrichit aux régions internes des centromères et phosphoryle les substrats situés aux kinétochores permettant ainsi la déstabilisation des attachements erronés pour leur donner une chance d'être corrigés. Aussi, Aurora B phosphoryle et active la kinésine, MCAK qui est responsable de la dépolymérisation des extrémités (+) des microtubules liant les kinétochores (Ruchaud, Carmena et al. 2007). L'attachement des deux kinétochores sœurs aux microtubules émanant des deux pôles opposés du fuseau mitotique (attachement bi-orienté) permet d'étirer le kinétochore et le centromère, ce qui sépare physiquement Aurora B de ces substrats situés au kinétochore. La PLK1 participe également à créer de la tension au niveau du centromère permettant la stabilisation de ces attachements (Sumara, Gimenez-Abian et al. 2004, van Vugt, van de Weerd et al. 2004, Ahonen, Kallio et al. 2005). Finalement, les phosphatases jouent un rôle primordial dans la stabilisation de ces attachements. Le recrutement de PP1 à la région externe du kinétochore est inversement proportionnel à l'activité d'Aurora B au centromère et à sa proximité physique avec le kinétochore. PP1 recruté permet de stabiliser la liaison kinétochore-microtubule (Liu, Vleugel et al. 2010). Il a été également démontré que la phosphatase PP2AB56 est nécessaire pour la stabilisation des attachements kinétochore-microtubule (Foley, Maldonado et al. 2011). La localisation d'Aurora B et de la PLK1 à la métaphase dans des cellules contrôles et déplétées en ARF6 serait donc à examiner ainsi qu'un éventuel rôle des phosphatases.

Dans cette étude, nous définissons une nouvelle régulation de la voie mTOR durant la mitose. En examinant les intermédiaires de cette voie dans des cellules déplétées en ARF6, nous avons démontré que la protéine ribosomale S6 est phosphorylée durant la mitose par deux kinases, la p85S6K1 et la S6K2, d'une manière dépendante de CDK1. La fonction

principale du mTORC1 est le contrôle de la synthèse des protéines via la phosphorylation directe de deux régulateurs de la translation, 4EBP1 et S6K1 (Ma and Blenis 2009). De très anciennes données suggéraient que la synthèse protéique est inhibée pendant la mitose (Steward, Shaeffer et al. 1968). Des études ultérieures ont également montré que la p70S6K1 est directement phosphorylée et négativement régulée par CDK1 pendant la mitose (Shah, Ghosh et al. 2003). Ce n'est que récemment que ce concept a changé. Un groupe a montré que la CDK1 peut activer 4EBP1 indépendamment de mTORC1 pour maintenir la synthèse des protéines tout au long de la mitose (Shuda, Velasquez et al. 2015). En accord avec cela, notre étude vient appuyer ce nouveau modèle et mettre en évidence une nouvelle régulation mitotique de la voie mTOR.

Parmi les kinases de S6, p70S6K1 est la plus étudiée et son rôle est le mieux caractérisé. En revanche, l'isoforme large de S6K1, p85S6K1 et le second membre de la famille S6K, S6K2 sont beaucoup moins connus. Contrairement à p70S6K1 qui est majoritairement cytoplasmique, p85S6K1 possède 23 acides aminés additionnels à son extrémité N-terminale contenant la séquence NLS (signal de localisation au noyau) qui prédit sa localisation nucléaire (Grove, Banerjee et al. 1991). Il a été proposé que cet isoforme jouait un rôle dans la transition G₁/S (Reinhard, Fernandez et al. 1994). De son côté, S6K2 partage 82% d'homologie de son domaine catalytique avec p70S6K1. De plus, elle possède une séquence NLS à son extrémité C-terminale (Koh, Jee et al. 1999) qui lui confère une localisation majoritairement nucléaire. Nos résultats montrent que p85S6K1 et S6K2 mais pas p70S6K1 sont activées pendant la mitose d'une manière dépendante de CDK1. Ceci corrèle parfaitement avec leur localisation nucléaire étant donné que le complexe CDK1-cycline B s'enrichit au noyau au début de la mitose (Gavet and Pines 2010) et il est très probable qu'il phosphoryle ces deux S6K dans le noyau avant la rupture de l'enveloppe nucléaire. Nous avons évalué la phosphorylation de ces deux kinases à la métaphase (1h après l'entrée en mitose) et il serait intéressant de vérifier leur état d'activation plus tôt en mitose. Comme l'inhibition de CDK1 abolit la phosphorylation de p85S6K1 et réduit la phosphorylation de S6K2, nous assumons que la phosphorylation de ces deux kinases est dépendante de CDK1. Néanmoins, l'inhibition de CDK1 force la sortie de la mitose et il se peut que la sensibilité de ces deux kinases à l'inhibition de CDK1 est due à la sortie de la mitose plutôt qu'à l'inhibition

de CDK1. Cette dernière hypothèse est peu probable puisque l'inhibition d'Aurora B cause une déphosphorylation de l'histone H3 sans affecter la phosphorylation de p85S6K1, S6K2 et S6 (Résultats non montrés), ce qui suggère que CDK1 a un effet direct sur la phosphorylation de ces deux kinases. Pour confirmer que CDK1 phosphoryle directement ces deux S6Ks, des essais *in vitro* de l'activité kinase sont à développer. Comme mentionné plus haut, il a été montré que CDK1 pouvait phosphoryler directement p70S6K1 sur plusieurs motifs Ser/Thr situés à l'extrémité C-terminale incluant la Ser424. Puisque ces motifs sont conservés entre p70S6K1, p85S6K1 et S6K2 (Gout, Minami et al. 1998, Koh, Jee et al. 1999, Lee-Fruman, Kuo et al. 1999), il ne serait pas surprenant que CDK1 puisse phosphoryler directement p85S6K1 et S6K2 sur ces motifs. Nos résultats montrent que la déplétion d'ARF6 bloque les cellules en mitose et inhibe la phosphorylation de p70S6K1 sur la Thr389. Cette observation est supportée par une étude démontrant que p70S6K1 est inhibée pendant la mitose (Shah, Ghosh et al. 2003). Cette même étude propose que la phosphorylation de p70S6K1 sur la Ser 424 est de nature inhibitrice. En revanche, nous assumons que la phosphorylation du Ser424 de la p85S6K1 et du Ser423 de la S6K2 est activatrice puisqu'elle corrèle parfaitement avec la phosphorylation de la protéine ribosomale S6.

L'inhibition de p70S6K1 dans les cellules déplétées en ARF6 pourrait également être due aux cellules non mitotiques, ce qui impliquerait la voie ARF6/PLD/PA/mTOR/S6K1 étant donné qu'ARF6 est connue pour activer la PLD et produire l'acide phosphatidique (Brown, Gutowski et al. 1993) et que ce dernier a été identifié comme un activateur de mTOR et de son substrat p70S6K1 (Fang, Vilella-Bach et al. 2001). La capacité d'ARF6 à contrôler les niveaux d'acide phosphatidique pourrait donc expliquer la diminution de l'activation de p70S6K1 dans les cellules déplétées de cette GTPase (Fingar, Richardson et al. 2004).

La voie mTOR contrôle le cycle cellulaire via ses effecteurs p70S6K1 et 4EBP1 et son inhibition bloque les cellules en phase G₁ (Fingar, Richardson et al. 2004). Bien que l'activité de p70S6K1 soit inhibée dans les HEK293 déplétées en ARF6, ces cellules n'étaient pas bloquées en phase G₁ mais plutôt en mitose. De plus, l'inhibition de mTOR par la rapamycine pendant 24h, dans les cellules HEK293 contrôles, abolit l'activation de p70S6K1 mais l'activité de 4EBP1 est inhibée partiellement au début (1h) et réémerge ultérieurement (4h) contrairement à l'inactivation de p70S6K1 qui perdure même après 24h (résultats non

montrés). Des résultats similaires concernant cette différence de régulation entre p70S6K1 et 4EBP1 ont été précédemment rapportés (Choo, Yoon et al. 2008). Aussi, nous avons constaté que l'inhibition de mTOR par la rapamycine (24h) a un effet minime sur le cycle cellulaire. Tous ces résultats indiquent que, dans les HEK293, la contribution du p70S6K1 au cycle cellulaire est négligeable.

Nos résultats montrent également que l'isoforme δ du 4EBP1 est activé exclusivement pendant la mitose. Ceci confirme ce qui a été découvert récemment soit que cet isoforme est directement phosphorylé et activé par CDK1 pendant la mitose (Shuda, Velasquez et al. 2015). En revanche, nous rapportons que les isoformes β et γ du 4EBP1 sont inhibés pendant la mitose et leur activation réapparaît progressivement après la sortie mitotique. L'inhibition mitotique des isoformes β et γ du 4EBP1 pourrait impliquer CDK1. Dans notre étude, nous avons utilisé l'appellation des isoformes 4EBP1 rapportée par les études antérieures (Shuda, Velasquez et al. 2015). Néanmoins, dans toutes nos expériences, l'isoforme δ du 4EBP1 est inversement proportionnel aux autres isoformes, en particulier les isoformes α et β . Donc, il est possible que l'isoforme supposé être l'isoforme δ ne soit que l'isoforme α , β ou γ qui est extensivement phosphorylé pendant la mitose, générant une bande qui migre plus haut en Western blot.

Dans notre modèle expérimental, nous assumons que la phosphorylation mitotique de S6 est assurée par les kinases p85S6K1 et S6K2 puisque le profil d'activation des 3 intermédiaires corrèlent parfaitement. Nos résultats ne corrèlent cependant pas avec ce qu'une étude antérieure a montré dans des kératinocytes humaines immortalisées (HaCaT) (Ramírez-Valle, Badura et al. 2010). Celle-ci propose que c'est la p70S6K1 qui phosphoryle S6 pendant la mitose.

Finalement, il est très important de comprendre pourquoi CDK1 choisit p85S6K1 et S6K2 pour activer S6 tandis qu'elle inhibe p70S6K1? Pourquoi CDK1 active l'isoforme δ tandis que qu'elle inhibe les isoformes β et γ ? Quelle est la pertinence de l'activation mitotique de S6 et de l'isoforme δ du 4EBP1? Nous suggérons un modèle où p70S6K1 et les isoformes β et γ du 4EBP1 sont cytoplasmiques et contrôlent la synthèse protéique globale, tandis que p85S6K1, S6K2 et l'isoforme δ du 4EBP1 sont nucléaires et contrôlent la synthèse protéique limitée dans le temps et l'espace au niveau de la cellule. Ainsi, dès l'entrée en mitose, CDK1

inactive p70S6K1 et les isoformes β et γ du 4EBP1 pour inhiber la synthèse protéique globale qui consomme beaucoup d'énergie. Parallèlement, la CDK1 active p85S6K1, S6K2 et l'isoforme δ du 4EBP1 pour permettre la synthèse protéique *in-situ* des protéines spécifiques nécessaires à la progression mitotique. Il est possible aussi qu'en régulant la synthèse *in-situ* de la cycline B pendant la mitose, CDK1 contrôle sa propre activité.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré que la GTPase ARF6 contrôle la prolifération à deux points différents du cycle cellulaire. D'abord, dans un contexte cardiovasculaire, nous avons prouvé qu'ARF6 contrôle la prolifération induite par l'AngII via les ROS. ARF6 promeut la production des ROS induite par l'AngII via la régulation positive de l'activation de Rac1 ainsi que l'expression de NOX1. Les ROS jouent un rôle d'intermédiaires pour induire la transactivation de l'EGFR et l'activation des MAP Kinases favorisant ainsi la transition G1/S et la prolifération. Deuxièmement, nous avons démontré qu'ARF6 est également nécessaire à la transition métaphase/anaphase durant la mitose. Bien que la congression des chromosomes soit normale en l'absence d'ARF6, nous rapportons que cette GTPase joue un rôle dans la stabilité des microtubules (fibres-K) et l'organisation des chromosomes au niveau de la plaque de métaphase. Nous montrons que les cellules déplétées en ARF6 présentent des fibres-K instables et un positionnement altéré des chromosomes lors de la métaphase. Ceci active le système SAC, prévient l'ubiquitination et la dégradation de la cycline B et bloque la transition métaphase/anaphase. Finalement, en étudiant la voie mTOR dans les cellules déplétées en ARF6, nous avons identifié un nouveau mécanisme de régulation de cette voie durant la mitose. Nous avons trouvé que les deux S6Ks, p85S6K1 et S6K2 sont activées d'une manière dépendante de CDK1 pour activer la protéine ribosomale S6 durant cette phase. Ces résultats montrent qu'en plus de sa fonction dans la migration et l'invasion cellulaire, ARF6 joue un rôle primordial dans la prolifération cellulaire et pourrait constituer une nouvelle cible pour le traitement de maladies telles que l'athérosclérose et le cancer.

Bibliographie

(1994). "Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)." Lancet **344**(8934): 1383-1389.

Abe, J.-i., J.-o. Deguchi, T. Matsumoto, N. Takuwa, M. Noda, M. Ohno, M. Makuuchi, K. Kurokawa and Y. Takuwa (1997). "Stimulated Activation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor In Vivo in Balloon-Injured Arteries A Link Between Angiotensin II and Intimal Thickening." Circulation **96**(6): 1906-1913.

Aguilera, G. (1992). "Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat." Mol Cell Endocrinol **90**(1): 53-60.

Ahonen, L. J., M. J. Kallio, J. R. Daum, M. Bolton, I. A. Manke, M. B. Yaffe, P. T. Stukenberg and G. J. Gorbsky (2005). "Polo-like kinase 1 creates the tension-sensing 3F3/2 phosphoepitope and modulates the association of spindle-checkpoint proteins at kinetochores." Curr Biol **15**(12): 1078-1089.

Aizawa, H., M. Kamijo, Y. Ohba, A. Mori, K. Okuhara, H. Kawasaki, H. Murofushi, K. Suzuki and H. Yasuda (1991). "Microtubule destabilization by cdc2/H1 histone kinase: phosphorylation of a "pro-rich region" in the microtubule-binding domain of MAP-4." Biochem Biophys Res Commun **179**(3): 1620-1626.

Albertinazzi, C., L. Za, S. Paris and I. de Curtis (2003). "ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth." Molecular biology of the cell **14**(4): 1295-1307.

Alberts, G. F., K. A. Peifley, A. Johns, J. F. Kleha and J. A. Winkles (1994). "Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop." Journal of Biological Chemistry **269**(13): 10112-10118.

Alfonso, F., R. A. Byrne, F. Rivero and A. Kastrati (2014). "Current Treatment of In-Stent Restenosis." Journal of the American College of Cardiology **63**(24): 2659-2673.

Arai, A., A. Jin, W. Yan, D. Mizuchi, K. Yamamoto, T. Nanki and O. Miura (2005). "SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through activation of Rac and its effector Pak kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis." Cell Signal **17**(4): 497-506.

Archambault, V. and D. M. Glover (2009). "Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(4): 265-275.

Aristarkhov, A., E. Eytan, A. Moghe, A. Admon, A. Hershko and J. V. Ruderman (1996). "E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4294-4299.

Arteaga, C. L. and J. A. Engelman (2014). "ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics." Cancer Cell **25**(3): 282-303.

Atherton-Fessler, S., L. L. Parker, R. L. Geahlen and H. Piwnicka-Worms (1993). "Mechanisms of p34cdc2 regulation." Molecular and Cellular Biology **13**(3): 1675-1685.

Axel, D. I., W. Kunert, C. Göggelmann, M. Oberhoff, C. Herdeg, A. Küttner, D. H. Wild, B. R. Brehm, R. Riessen and G. Köveker (1997). "Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery." Circulation **96**(2): 636-645.

Bagrodia, S., B. Derijard, R. J. Davis and R. A. Cerione (1995). "Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation." J Biol Chem **270**(47): 27995-27998.

Barr, A. R. and F. Gergely (2007). "Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles." Journal of cell science **120**(17): 2987-2996.

Beck, J., S. Maerki, M. Posch, T. Metzger, A. Persaud, H. Scheel, K. Hofmann, D. Rotin, P. Pedrioli, J. R. Swedlow, M. Peter and I. Sumara (2013). "Ubiquitylation-dependent localization of PLK1 in mitosis." Nat Cell Biol **15**(4): 430-439.

Behrends, C. and J. W. Harper (2011). "Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains." Nat Struct Mol Biol **18**(5): 520-528.

Bell, L. and J. A. Madri (1990). "Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration." Am J Pathol **137**(1): 7-12.

Ben-Levy, R., S. Hooper, R. Wilson, H. F. Paterson and C. J. Marshall (1998). "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." Current Biology **8**(19): 1049-1057.

Bertoli, C., J. M. Skotheim and R. A. M. de Bruin (2013). "Control of cell cycle transcription during G1 and S phases." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(8): 518-528.

Berzat, A. C., J. E. Buss, E. J. Chenette, C. A. Weinbaum, A. Shutes, C. J. Der, A. Minden and A. D. Cox (2005). "Transforming activity of the Rho family GTPase, Wrch-1, a Wnt-regulated Cdc42 homolog, is dependent on a novel carboxyl-terminal palmitoylation motif." J Biol Chem **280**(38): 33055-33065.

Bharti, S., H. Inoue, K. Bharti, D. S. Hirsch, Z. Nie, H. Y. Yoon, V. Artym, K. M. Yamada, S. C. Mueller, V. A. Barr and P. A. Randazzo (2007). "Src-dependent phosphorylation of ASAP1 regulates podosomes." Mol Cell Biol **27**(23): 8271-8283.

Bienert, G. P. and F. Chaumont (2014). "Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide." Biochim Biophys Acta **1840**(5): 1596-1604.

Blaes, N. and J. P. Boissel (1983). "Growth-stimulating effect of catecholamines on rat aortic smooth muscle cells in culture." Journal of cellular physiology **116**(2): 167-172.

Blangy, A., H. A. Lane, P. d'Herin, M. Harper, M. Kress and E. A. Nigg (1995). "Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo." Cell **83**(7): 1159-1169.

Blommaart, E. F., J. J. Luiken, P. J. Blommaart, G. M. van Woerkom and A. J. Meijer (1995). "Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes." J Biol Chem **270**(5): 2320-2326.

Bode, A. M. and Z. Dong (2007). "The functional contrariety of JNK." Molecular Carcinogenesis **46**(8): 591-598.

Bogoyevitch, M. A., K. R. Ngoei, T. T. Zhao, Y. Y. Yeap and D. C. Ng (2010). "c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges." Biochim Biophys Acta **1804**(3): 463-475.

Booher, R. N., P. S. Holman and A. Fattaey (1997). "Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity." Journal of Biological Chemistry **272**(35): 22300-22306.

Bos, J. L., H. Rehmann and A. Wittinghofer (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-877.

Boshans, R. L., S. Szanto, L. van Aelst and C. D'Souza-Schorey (2000). "ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates Actin Cytoskeleton Remodeling in Coordination with Rac1 and RhoA." Molecular and Cellular Biology **20**(10): 3685-3694.

Boshans, R. L., S. Szanto, L. van Aelst and C. D'Souza-Schorey (2000). "ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA." Mol Cell Biol **20**(10): 3685-3694.

Boulton, T., G. Yancopoulos, J. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu and M. Cobb (1990). "An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control." Science **249**(4964): 64-67.

Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb and G. D. Yancopoulos (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." Cell **65**(4): 663-675.

Bradley, J. R. and J. S. Pober (2001). "Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)." Oncogene **20**(44): 6482-6491.

Brewer, A. C., E. C. Sparks and A. M. Shah (2006). "Transcriptional regulation of the NADPH oxidase isoform, Nox1, in colon epithelial cells: role of GATA-binding factor (s)." Free Radical Biology and Medicine **40**(2): 260-274.

Brickner, D. G. and J. H. Brickner (2011). "Gene positioning is regulated by phosphorylation of the nuclear pore complex by Cdk1." Cell Cycle **10**(3): 392-395.

Briones, A. M. and R. M. Touyz (2010). "Oxidative stress and hypertension: current concepts." Curr Hypertens Rep **12**(2): 135-142.

Brizuela, L., G. Draetta and D. Beach (1989). "Activation of human CDC2 protein as a histone H1 kinase is associated with complex formation with the p62 subunit." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(12): 4362-4366.

Brown, H. A., S. Gutowski, C. R. Moomaw, C. Slaughter and P. C. Sternweis (1993). "ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity." Cell **75**(6): 1137-1144.

Brown, K. D., R. M. Coulson, T. J. Yen and D. W. Cleveland (1994). "Cyclin-like accumulation and loss of the putative kinetochore motor CENP-E results from coupling continuous synthesis with specific degradation at the end of mitosis." J Cell Biol **125**(6): 1303-1312.

Brugarolas, J., K. Lei, R. L. Hurley, B. D. Manning, J. H. Reiling, E. Hafen, L. A. Witters, L. W. Ellisen and W. G. Kaelin, Jr. (2004). "Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex." Genes Dev **18**(23): 2893-2904.

Bunemann, M., M. Frank and M. J. Lohse (2003). "Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 16077-16082.

Burkard, M. E., C. L. Randall, S. Larochelle, C. Zhang, K. M. Shokat, R. P. Fisher and P. V. Jallepalli (2007). "Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(11): 4383-4388.

Burstein, E. S., D. J. Hesterberg, J. S. Gutkind, M. R. Brann, E. A. Currier and T. L. Messier (1998). "The ras-related GTPase rac1 regulates a proliferative pathway selectively utilized by G-protein coupled receptors." Oncogene **17**(12): 1617-1623.

Buschhorn, B. A. and J.-M. Peters (2006). "How APC/C orders destruction." Nat Cell Biol **8**(3): 209-211.

Buxade, M., J. L. Parra-Palau and C. G. Proud (2008). "The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases)." Front Biosci **13**: 5359-5373.

Cafferkey, R., P. R. Young, M. M. McLaughlin, D. J. Bergsma, Y. Koltin, G. M. Sathe, L. Faucette, W. K. Eng, R. K. Johnson and G. P. Livi (1993). "Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity." Mol Cell Biol **13**(10): 6012-6023.

Cai, B., S. H. Chang, E. B. Becker, A. Bonni and Z. Xia (2006). "p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65." J Biol Chem **281**(35): 25215-25222.

Cai, S., C. B. O'Connell, A. Khodjakov and C. E. Walczak (2009). "Chromosome congression in the absence of kinetochore fibres." Nat Cell Biol **11**(7): 832-838.

Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases." Microbiol Mol Biol Rev **75**(1): 50-83.

Carmena, M. and W. C. Earnshaw (2003). "The cellular geography of aurora kinases." Nature reviews Molecular cell biology **4**(11): 842-854.

Carroll, C. W., M. Enquist-Newman and D. O. Morgan (2005). "The APC subunit Doc1 promotes recognition of the substrate destruction box." Curr Biol **15**(1): 11-18.

Casanova, J. E. (2007). "Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors." Traffic **8**(11): 1476-1485.

Chan, A. K., A. Kalmes, S. Hawkins, G. Daum and A. W. Clowes (2003). "Blockade of the epidermal growth factor receptor decreases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery." J Vasc Surg **37**(3): 644-649.

Chan, A. K., S. Persad, D. W. Litchfield and J. A. Wright (1999). "Ribonucleotide reductase R2 protein is phosphorylated at serine-20 by P34cdc2 kinase." Biochim Biophys Acta **1448**(3): 363-371.

Chang, D. C., N. Xu and K. Q. Luo (2003). "Degradation of Cyclin B Is Required for the Onset of Anaphase in Mammalian Cells." Journal of Biological Chemistry **278**(39): 37865-37873.

Chang, F., C. Lemmon, D. Lietha, M. Eck and L. Romer (2011). "Tyrosine phosphorylation of Rac1: a role in regulation of cell spreading." PLoS One **6**(12): e28587.

Chao, W. C., K. Kulkarni, Z. Zhang, E. H. Kong and D. Barford (2012). "Structure of the mitotic checkpoint complex." Nature **484**(7393): 208-213.

Charles, R., Y. Namkung, M. Cotton, S. A. Laporte and A. Claing (2016). "beta-Arrestin-mediated Angiotensin II Signaling Controls the Activation of ARF6 Protein and Endocytosis in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells." J Biol Chem **291**(8): 3967-3981.

Chavrier, P. and J. Menetrey (2010). "Toward a structural understanding of arf family:effector specificity." Structure **18**(12): 1552-1558.

Chen, L., J. A. Mayer, T. I. Krisko, C. W. Speers, T. Wang, S. G. Hilsenbeck and P. H. Brown (2009). "Inhibition of the p38 Kinase Suppresses the Proliferation of Human ER-Negative Breast Cancer Cells." Cancer Res **69**(23): 8853-8861.

Chen, Q., X. Zhang, Q. Jiang, P. R. Clarke and C. Zhang (2008). "Cyclin B1 is localized to unattached kinetochores and contributes to efficient microtubule attachment and proper chromosome alignment during mitosis." Cell research **18**(2): 268-280.

Chen, R., C. Sarnecki and J. Blenis (1992). "Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases." Molecular and cellular biology **12**(3): 915-927.

Choo, A. Y., S. O. Yoon, S. G. Kim, P. P. Roux and J. Blenis (2008). "Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(45): 17414-17419.

Clempus, R. E. and K. K. Griendling (2006). "Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells." Cardiovascular research **71**(2): 216-225.

Colicelli, J. (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases." Sci STKE **2004**(250): Re13.

Collas, P., K. Le Guellec and K. Tasken (1999). "The A-kinase-anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis." J Cell Biol **147**(6): 1167-1180.

Costa, M. A. and D. I. Simon (2005). "Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents." Circulation **111**(17): 2257-2273.

Côté, J.-F. and K. Vuori (2007). "GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways." Trends in cell biology **17**(8): 383-393.

Crawley, J. B., L. Rawlinson, F. V. Lali, T. H. Page, J. Saklatvala and B. M. Foxwell (1997). "T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation." J Biol Chem **272**(23): 15023-15027.

Crosby, M. (2007). "Cell Cycle: Principles of Control." Yale J Biol Med. **80**(3): 141-142. Epub 2008 Feb.

Cuadrado, A. and Angel R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." Biochemical Journal **429**(3): 403-417.

Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1773**(8): 1358-1375.

Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1358-1375.

Cukierman, E., I. Huber, M. Rotman and D. Cassel (1995). "The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization." Science **270**(5244): 1999-2002.

Cunningham, J. T., J. T. Rodgers, D. H. Arlow, F. Vazquez, V. K. Mootha and P. Puigserver (2007). "mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex." Nature **450**(7170): 736-740.

d'Herin, B. A. L. H. and P. H. M. K. M. Nigg (1995). "EA Phosphorylation by p34 cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo." Cell **83**: 1159-1169.

D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier (2006). "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 347-358.

D'Souza-Schorey, C., E. van Donselaar, V. W. Hsu, C. Yang, P. D. Stahl and P. J. Peters (1998). "ARF6 Targets Recycling Vesicles to the Plasma Membrane: Insights from an Ultrastructural Investigation." The Journal of Cell Biology **140**(3): 603-616.

D'Souza-Schorey, C., R. L. Boshans, M. McDonough, P. D. Stahl and L. Van Aelst (1997). "A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements." The EMBO Journal **16**(17): 5445-5454.

da Fonseca, P. C., E. H. Kong, Z. Zhang, A. Schreiber, M. A. Williams, E. P. Morris and D. Barford (2011). "Structures of APC/C(Cdh1) with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor." Nature **470**(7333): 274-278.

Daemen, M. J., D. M. Lombardi, F. T. Bosman and S. M. Schwartz (1991). "Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall." Circ Res **68**(2): 450-456.

Daugherty, A., M. W. Manning and L. A. Cassis (2000). "Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice." J Clin Invest **105**(11): 1605-1612.

Daugherty, A., D. L. Rateri, H. Lu, T. Inagami and L. A. Cassis (2004). "Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor." Circulation **110**(25): 3849-3857.

Davis-Dusenbery, B. N., C. Wu and A. Hata (2011). "Micromanaging Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Modulation." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **31**(11): 2370-2377.

De Antoni, A., C. G. Pearson, D. Cimini, J. C. Canman, V. Sala, L. Nezi, M. Mapelli, L. Sironi, M. Faretta, E. D. Salmon and A. Musacchio (2005). "The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint." Curr Biol **15**(3): 214-225.

de Napoles, M., J. E. Mermoud, R. Wakao, Y. A. Tang, M. Endoh, R. Appanah, T. B. Nesterova, J. Silva, A. P. Otte, M. Vidal, H. Koseki and N. Brockdorff (2004). "Polycomb

group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation." Dev Cell **7**(5): 663-676.

Delafontaine, P. and L. Ku (1997). "Reactive oxygen species stimulate insulin-like growth factor I synthesis in vascular smooth muscle cells." Cardiovascular research **33**(1): 216-222.

Delafontaine, P. and H. Lou (1993). "Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells." Journal of Biological Chemistry **268**(22): 16866-16870.

den Elzen, N. and J. Pines (2001). "Cyclin a Is Destroyed in Prometaphase and Can Delay Chromosome Alignment and Anaphase." The Journal of Cell Biology **153**(1): 121-136.

Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." Oncogene **27**(48): 6245-6251.

Di Cesare, A., S. Paris, C. Albertinazzi, S. Dariozzi, J. Andersen, M. Mann, R. Longhi and I. de Curtis (2000). "p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin." Nature Cell Biology **2**(8): 521-530.

Dibble, C. C., J. M. Asara and B. D. Manning (2009). "Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1." Mol Cell Biol **29**(21): 5657-5670.

Dohadwala, M., E. F. da Cruz e Silva, F. L. Hall, R. T. Williams, D. A. Carbonaro-Hall, A. C. Nairn, P. Greengard and N. Berndt (1994). "Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6408-6412.

Donaldson, J. G. and C. L. Jackson (2011). "ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(6): 362-375.

Dong, C., D. D. Yang, M. Wysk, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis and R. A. Flavell (1998). "Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1." Science **282**(5396): 2092-2095.

Downes, G. B. and N. Gautam (1999). "The G protein subunit gene families." Genomics **62**(3): 544-552.

Draetta, G., H. Piwnica-Worms, D. Morrison, B. Druker, T. Roberts and D. Beach (1987). "Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate." Nature **336**(6201): 738-744.

Dransart, E., B. Olofsson and J. Cherfils (2005). "RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation." Traffic **6**(11): 957-966.

Dreux, A. C., D. J. Lamb, H. Modjtahedi and G. A. Ferns (2006). "The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis." Atherosclerosis **186**(1): 38-53.

Drummond, G. R., S. Selemidis, K. K. Griendling and C. G. Sobey (2011). "Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets." Nat Rev Drug Discov **10**(6): 453-471.

Duvel, K., J. L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A. I. Lipovsky, A. L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M. G. Vander Heiden, J. P. MacKeigan, P. M. Finan, C. B. Clish, L. O. Murphy and B. D. Manning (2010). "Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1." Mol Cell **39**(2): 171-183.

Dyer, N., E. Rebollo, P. Domínguez, N. Elkhatab, P. Chavrier, L. Daviet, C. González and M. González-Gaitán (2007). "Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes." Development **134**(24): 4437-4447.

Dzau, V. J. (1993). "Vascular renin-angiotensin system and vascular protection." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 5**: S1-9.

Eden, S., R. Rohatgi, A. V. Podtelejnikov, M. Mann and M. W. Kirschner (2002). "Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck." Nature **418**(6899): 790-793.

Edwards, D. C., L. C. Sanders, G. M. Bokoch and G. N. Gill (1999). "Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." Nat Cell Biol **1**(5): 253-259.

Elia, A. E. H., P. Rellos, L. F. Haire, J. W. Chao, F. J. Ivins, K. Hoepker, D. Mohammad, L. C. Cantley, S. J. Smerdon and M. B. Yaffe (2003). "The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain." Cell **115**(1): 83-95.

Elliott, K. J., A. M. Bourne, T. Takayanagi, A. Takaguri, T. Kobayashi, K. Eguchi and S. Eguchi (2013). "ADAM17 silencing by adenovirus encoding miRNA-embedded siRNA revealed essential signal transduction by angiotensin II in vascular smooth muscle cells." J Mol Cell Cardiol **62**: 1-7.

Enslen, H., J. Raingeaud and R. J. Davis (1998). "Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6." J Biol Chem **273**(3): 1741-1748.

Falk, E., M. Nakano, J. F. Bentzon, A. V. Finn and R. Virmani (2013). "Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view." European Heart Journal **34**(10): 719-728.

Fang, G., H. Yu and M. W. Kirschner (1998). "The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation." Genes Dev **12**(12): 1871-1883.

Fang, G., H. Yu and M. W. Kirschner (1998). "Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1." Mol Cell **2**(2): 163-171.

Fang, Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan and J. Chen (2001). "Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling." Science **294**(5548): 1942-1945.

Fang, Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan and J. Chen (2001). "Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of mTOR Signaling." Science **294**(5548): 1942-1945.

Feine, O., A. Zur, H. Mahbubani and M. Brandeis (2007). "Human Kid is degraded by the APC/C(Cdh1) but not by the APC/C(Cdc20)." Cell Cycle **6**(20): 2516-2523.

Ferns, G. A., E. W. Raines, K. H. Sprugel, A. S. Motani, M. A. Reidy and R. Ross (1991). "Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF." Science **253**(5024): 1129-1132.

Fielding, A. B., E. Schonteich, J. Matheson, G. Wilson, X. Yu, G. R. X. Hickson, S. Srivastava, S. A. Baldwin, R. Prekeris and G. W. Gould (2005). "Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the Exocyst to control membrane traffic in cytokinesis." EMBO J **24**(19): 3389-3399.

Fingar, D. C., C. J. Richardson, A. R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou and J. Blenis (2004). "mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E." Molecular and Cellular Biology **24**(1): 200-216.

Finkel, T. (2011). "Signal transduction by reactive oxygen species." J Cell Biol **194**(1): 7-15.

Foley, E. A., M. Maldonado and T. M. Kapoor (2011). "Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase." Nat Cell Biol **13**(10): 1265-1271.

Folkow, B. (1982). "Physiological aspects of primary hypertension." Physiological Reviews **62**(2): 347-504.

Forrester, S. J., T. Kawai, S. O'Brien, W. Thomas, R. C. Harris and S. Eguchi (2016). "Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Mechanisms, Pathophysiology, and Potential Therapies in the Cardiovascular System." Annu Rev Pharmacol Toxicol **56**: 627-653.

Fourest-Lieuvin, A., L. Peris, V. Gache, I. Garcia-Saez, C. Juillan-Binard, V. Lantiez and D. Job (2006). "Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1." Molecular biology of the cell **17**(3): 1041-1050.

Frank, G. D., S. Eguchi, T. Yamakawa, S.-i. Tanaka, T. Inagami and E. D. Motley (2000). "Involvement of Reactive Oxygen Species in the Activation of Tyrosine Kinase and

Extracellular Signal-Regulated Kinase by Angiotensin II 1." Endocrinology **141**(9): 3120-3126.

Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-1272.

Gáborik, Z., M. Szaszák, L. Szidonya, B. Balla, S. Paku, K. J. Catt, A. J. L. Clark and L. Hunyady (2001). "β-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor." Molecular Pharmacology **59**(2): 239-247.

Gales, C., J. J. J. Van Durm, S. Schaak, S. Pontier, Y. Percherancier, M. Audet, H. Paris and M. Bouvier (2006). "Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 778-786.

Ganley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen and X. Jiang (2009). "ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy." J Biol Chem **284**(18): 12297-12305.

Gavet, O. and J. Pines (2010). "Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis." The Journal of Cell Biology **189**(2): 247-259.

Geiszt, M., J. B. Kopp, P. Várnai and T. L. Leto (2000). "Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(14): 8010-8014.

Geley, S., E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J.-M. Peters and T. Hunt (2001). "Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome–Dependent Proteolysis of Human Cyclin a Starts at the Beginning of Mitosis and Is Not Subject to the Spindle Assembly Checkpoint." The Journal of Cell Biology **153**(1): 137-148.

George, A. J., R. D. Hannan and W. G. Thomas (2013). "Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches." Febs.j **280**(21): 5258-5268.

George, A. J., B. W. Purdue, C. M. Gould, D. W. Thomas, Y. Handoko, H. Qian, G. A. Quaife-Ryan, K. A. Morgan, K. J. Simpson, W. G. Thomas and R. D. Hannan (2013). "A

functional siRNA screen identifies genes modulating angiotensin II-mediated EGFR transactivation." J Cell Sci **126**(Pt 23): 5377-5390.

Gharbi-Ayachi, A., J.-C. Labbé, A. Burgess, S. Vigneron, J.-M. Strub, E. Brioudes, A. Van-Dorsselaer, A. Castro and T. Lorca (2010). "The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A." Science **330**(6011): 1673-1677.

Ghosh, E., P. Kumari, D. Jaiman and A. K. Shukla (2015). "Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution." Nat Rev Mol Cell Biol **16**(2): 69-81.

Giannoni, E., F. Buricchi, G. Rauei, G. Ramponi and P. Chiarugi (2005). "Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth." Mol Cell Biol **25**(15): 6391-6403.

Giet, R., C. Petretti and C. Prigent (2005). "Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?" Trends in cell biology **15**(5): 241-250.

Gille, H., M. Kortenjann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M. H. Cobb and P. E. Shaw (1995). "ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation." Embo j **14**(5): 951-962.

Gillingham, A. K. and S. Munro (2007). "The small G proteins of the Arf family and their regulators." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 579-611.

Gillingham, A. K. and S. Munro (2007). "The small G proteins of the Arf family and their regulators." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **23**: 579-611.

Glutzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-138.

Godek, K. M., L. Kabeche and D. A. Compton (2015). "Regulation of kinetochore–microtubule attachments through homeostatic control during mitosis." Nature reviews. Molecular cell biology **16**(1): 57-64.

Golan, A., Y. Yudkovsky and A. Hershko (2002). "The Cyclin-Ubiquitin Ligase Activity of Cyclosome/APC Is Jointly Activated by Protein Kinases Cdk1-Cyclin B and Plk." Journal of Biological Chemistry **277**(18): 15552-15557.

Goldsmith, Z. G. and D. N. Dhanasekaran (2007). "G protein regulation of MAPK networks." Oncogene **26**(22): 3122-3142.

Gordeeva, A. V., R. A. Zvyagilskaya and Y. A. Labas (2003). "Cross-Talk between Reactive Oxygen Species and Calcium in Living Cells." Biochemistry (Moscow) **68**(10): 1077-1080.

Goto, H., T. Kiyono, Y. Tomono, A. Kawajiri, T. Urano, K. Furukawa, E. A. Nigg and M. Inagaki (2006). "Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition." Nat Cell Biol **8**(2): 180-187.

Goto, H., Y. Yasui, E. A. Nigg and M. Inagaki (2002). "Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation." Genes to Cells **7**(1): 11-17.

Gout, I., T. Minami, K. Hara, Y. Tsujishita, V. Filonenko, M. D. Waterfield and K. Yonezawa (1998). "Molecular Cloning and Characterization of a Novel p70 S6 Kinase, p70 S6 Kinase β Containing a Proline-rich Region." Journal of Biological Chemistry **273**(46): 30061-30064.

Griendling, K. K., D. Sorescu and M. Ushio-Fukai (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.

Grove, J. R., P. Banerjee, A. Balasubramanyam, P. J. Coffey, D. J. Price, J. Avruch and J. R. Woodgett (1991). "Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini." Mol Cell Biol **11**(11): 5541-5550.

Guéraud, F., M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P. M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems and K. Uchida (2010). "Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products." Free radical research **44**(10): 1098-1124.

Guse, A., M. Mishima and M. Glotzer (2005). "Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis." Current biology **15**(8): 778-786.

Gutiérrez-Uzquiza, Á., M. Arechederra, P. Bragado, J. A. Aguirre-Ghiso and A. Porras (2012). "p38 α Mediates Cell Survival in Response to Oxidative Stress via Induction of

Antioxidant Genes: EFFECT ON THE p70S6K PATHWAY." J Biol Chem **287**(4): 2632-2642.

Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk and R. J. Shaw (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Mol Cell **30**(2): 214-226.

Hahn, A., T. r. J. Resink, T. Scott-Burden, J. Powell, Y. Dohi and F. R. Bühler (1990). "Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function." Cell regulation **1**(9): 649-659.

Han, Y., M. S. Runge and A. R. Brasier (1999). "Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors." Circulation Research **84**(6): 695-703.

Hansen, D. V., A. V. Loktev, K. H. Ban and P. K. Jackson (2004). "Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1." Mol Biol Cell **15**(12): 5623-5634.

Hara, K., K. Yonezawa, Q. P. Weng, M. T. Kozlowski, C. Belham and J. Avruch (1998). "Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism." J Biol Chem **273**(23): 14484-14494.

Harbour, J. W., R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo and D. C. Dean (1999). "Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1." Cell **98**(6): 859-869.

Harper, J. W. and S. J. Elledge (1998). "The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective." Genes Dev **12**(3): 285-289.

Harrison, D., K. K. Griendling, U. Landmesser, B. Hornig and H. Drexler (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." Am J Cardiol **91**(3a): 7a-11a.

Hashimoto, S., Y. Onodera, A. Hashimoto, M. Tanaka, M. Hamaguchi, A. Yamada and H. Sabe (2004). "Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6647-6652.

Heald, R. and F. McKeon (1990). "Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis." Cell **61**(4): 579-589.

Heasman, S. J. and A. J. Ridley (2008). "Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 690-701.

Herbert, J.-M., F. Bono and P. Savi (1996). "The mitogenic effect of H₂O₂ for vascular smooth muscle cells is mediated by an increase of the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor." FEBS letters **395**(1): 43-47.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.

Hervent, A.-S. and G. W. De Keulenaer (2012). "Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity Induced by ErbB Receptor Inhibitor Cancer Therapeutics." International Journal of Molecular Sciences **13**(10): 12268.

Herzog, F., I. Primorac, P. Dube, P. Lenart, B. Sander, K. Mechtler, H. Stark and J. M. Peters (2009). "Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex." Science **323**(5920): 1477-1481.

Hewitt, L., A. Tighe, S. Santaguida, A. M. White, C. D. Jones, A. Musacchio, S. Green and S. S. Taylor (2010). "Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1–C-Mad2 core complex." The Journal of Cell Biology **190**(1): 25-34.

Higuchi, S., H. Ohtsu, H. Suzuki, H. Shirai, G. D. Frank and S. Eguchi (2007). "Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology." Clin Sci (Lond) **112**(8): 417-428.

Hilenski, L. L., R. E. Clempus, M. T. Quinn, J. D. Lambeth and K. K. Griendling (2004). "Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(4): 677-683.

Hirata, Y., Y. Takagi, Y. Fukuda and F. Maruno (1989). "Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells." Atherosclerosis **78**(2): 225-228.

Hiroi, T., A. Someya, W. Thompson, J. Moss and M. Vaughan (2006). "GEP100/BRAG2: activator of ADP-ribosylation factor 6 for regulation of cell adhesion and

actin cytoskeleton via E-cadherin and alpha-catenin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10672-10677.

Hirota, T., N. Kunitoku, T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, M. Nitta, K. Hatakeyama and H. Saya (2003). "Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells." Cell **114**(5): 585-598.

Hirota, T., J. J. Lipp, B.-H. Toh and J.-M. Peters (2005). "Histone H3 serine[thinsp]10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin." Nature **438**(7071): 1176-1180.

Hochegger, H., S. Takeda and T. Hunt (2008). "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" Nat Rev Mol Cell Biol **9**(11): 910-916.

Hodge, R. G. and A. J. Ridley (2016). "Regulating Rho GTPases and their regulators." Nat Rev Mol Cell Biol **advance online publication**.

Hoffmann, I., P. Clarke, M. J. Marcote, E. Karsenti and G. Draetta (1993). "Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis." The EMBO journal **12**(1): 53.

Holt, L. J., B. B. Tuch, J. Villén, A. D. Johnson, S. P. Gygi and D. O. Morgan (2009). "Global Analysis of Cdk1 Substrate Phosphorylation Sites Provides Insights into Evolution." Science **325**(5948): 1682-1686.

Honda, A., M. Nogami, T. Yokozeki, M. Yamazaki, H. Nakamura, H. Watanabe, K. Kawamoto, K. Nakayama, A. J. Morris, M. A. Frohman and Y. Kanaho (1999). "Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation." Cell **99**(5): 521-532.

Hordijk, P. L. (2006). "Regulation of NADPH oxidases." Circulation research **98**(4): 453-462.

Hordijk, P. L. (2006). "Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins." Circ Res **98**(4): 453-462.

Huang, C., Z. Rajfur, C. Borchers, M. D. Schaller and K. Jacobson (2003). "JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration." Nature **424**(6945): 219-223.

Huang, J., C. C. Dibble, M. Matsuzaki and B. D. Manning (2008). "The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2." Mol Cell Biol **28**(12): 4104-4115.

Hubbard, S. R. (2004). "Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 464-471.

Huckle, W. R. and H. S. Earp (1994). "Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II." Prog Growth Factor Res **5**(2): 177-194.

Hudson, C. C., M. Liu, G. G. Chiang, D. M. Otterness, D. C. Loomis, F. Kaper, A. J. Giaccia and R. T. Abraham (2002). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin." Mol Cell Biol **22**(20): 7004-7014.

Hulsmans, M. and P. Holvoet (2010). "The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis." J Cell Mol Med **14**(1-2): 70-78.

Hunt, T., F. C. Luca and J. V. Ruderman (1992). "The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo." J Cell Biol **116**(3): 707-724.

Hunyady, L. and K. J. Catt (2006). "Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II." Mol Endocrinol **20**(5): 953-970.

Ikenouchi, J. and M. Umeda (2010). "FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(2): 748-753.

Inoki, K., Y. Li, T. Xu and K. L. Guan (2003). "Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling." Genes Dev **17**(15): 1829-1834.

Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu and K. L. Guan (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." Nat Cell Biol **4**(9): 648-657.

Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C. Y. Wang, X. He, O. A. MacDougald, M. You, B. O. Williams

and K. L. Guan (2006). "TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth." Cell **126**(5): 955-968.

Inoki, K., T. Zhu and K. L. Guan (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." Cell **115**(5): 577-590.

Inoue, H. and P. A. Randazzo (2007). "Arf GAPs and their interacting proteins." Traffic **8**(11): 1465-1475.

Itoh, H., M. Mukoyama, R. E. Pratt, G. H. Gibbons and V. J. Dzau (1993). "Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II." Journal of Clinical Investigation **91**(5): 2268.

Izawa, D. and J. Pines (2015). "The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C." Nature **517**(7536): 631-634.

Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall and M. N. Hall (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." Nat Cell Biol **6**(11): 1122-1128.

Jackman, M., C. Lindon, E. A. Nigg and J. Pines (2003). "Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase." Nat Cell Biol **5**(2): 143-148.

Jaeschke, A., M. Karasarides, J. J. Ventura, A. Ehrhardt, C. Zhang, R. A. Flavell, K. M. Shokat and R. J. Davis (2006). "JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor." Mol Cell **23**(6): 899-911.

Jaspersen, S. L., J. F. Charles and D. O. Morgan (1999). "Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14." Curr Biol **9**(5): 227-236.

Jia, L., B. Li and H. Yu (2016). "The Bub1–Plk1 kinase complex promotes spindle checkpoint signalling through Cdc20 phosphorylation." Nature Communications **7**: 10818.

Jin, L., A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp and M. Rape (2008). "Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex." Cell **133**(4): 653-665.

Joo, H. Y., L. Zhai, C. Yang, S. Nie, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. Chang and H. Wang (2007). "Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination." Nature **449**(7165): 1068-1072.

Joseph, N., A. Hutterer, I. Poser and M. Mishima (2012). "ARF6 GTPase protects the post-mitotic midbody from 14-3-3-mediated disintegration." The EMBO Journal **31**(11): 2604-2614.

Kabeche, L. and D. A. Compton (2013). "Cyclin A regulates kinetochore microtubules to promote faithful chromosome segregation." Nature **502**(7469): 110-113.

Kagiyama, S., S. Eguchi, G. D. Frank, T. Inagami, Y. C. Zhang and M. I. Phillips (2002). "Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense." Circulation **106**(8): 909-912.

Kagiyama, S., K. Qian, T. Kagiyama and M. I. Phillips (2003). "Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy." Hypertension **41**(3 Pt 2): 824-829.

Kagota, S., Y. Tada, Y. Kubota, N. Nejime, Y. Yamaguchi, K. Nakamura, M. Kunitomo and K. Shinozuka (2007). "Peroxynitrite is involved in the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats." J Cardiovasc Pharmacol **50**(6): 677-685.

Kalaszczynska, I., Y. Geng, T. Iino, S. Mizuno, Y. Choi, I. Kondratiuk, D. P. Silver, D. J. Wolgemuth, K. Akashi and P. Sicinski (2009). "Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells." Cell **138**(2): 352-365.

Kantidakis, T., B. A. Ramsbottom, J. L. Birch, S. N. Dowding and R. J. White (2010). "mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(26): 11823-11828.

Kapahi, P., D. Chen, A. N. Rogers, S. D. Katewa, P. W. Li, E. L. Thomas and L. Kockel (2010). "With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging." Cell Metab **11**(6): 453-465.

Katritch, V., V. Cherezov and R. C. Stevens (2013). "Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 531-556.

Kawashima, S. A., Y. Yamagishi, T. Honda, K.-i. Ishiguro and Y. Watanabe (2010). "Phosphorylation of H2A by Bub1 Prevents Chromosomal Instability Through Localizing Shugoshin." Science **327**(5962): 172-177.

Kayanoki, Y., S. Higashiyama, K. Suzuki, M. Asahi, S. Kawata, Y. Matsuzawa and N. Taniguchi (1999). "The requirement of both intracellular reactive oxygen species and intracellular calcium elevation for the induction of heparin-binding EGF-like growth factor in vascular endothelial cells and smooth muscle cells." Biochemical and biophysical research communications **259**(1): 50-55.

Keidar, S., J. Attias, J. Smith, J. L. Breslow and T. Hayek (1997). "The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Biochem Biophys Res Commun **236**(3): 622-625.

Kellogg, D. R. (2003). "Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division." J Cell Sci **116**(Pt 24): 4883-4890.

Kelly, A. E. and H. Funabiki (2009). "Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view." Current opinion in cell biology **21**(1): 51-58.

Kenakin, T. and A. Christopoulos (2013). "Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact." Nat Rev Drug Discov **12**(3): 205-216.

Kerkhoff, E. and U. R. Rapp (1998). "Cell cycle targets of Ras/Raf signalling." Oncogene **17**(11 Reviews): 1457-1462.

Keryer, G., M. Yassenko, J.-C. Labbé, A. Castro, S. M. Lohmann, D. Evain-Brion and K. Taskén (1998). "Mitosis-specific Phosphorylation and Subcellular Redistribution of the RII α Regulatory Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase." Journal of Biological Chemistry **273**(51): 34594-34602.

Kim, E., P. Goraksha-Hicks, L. Li, T. P. Neufeld and K. L. Guan (2008). "Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response." Nat Cell Biol **10**(8): 935-945.

Kim, G. Y., S. E. Mercer, D. Z. Ewton, Z. Yan, K. Jin and E. Friedman (2002). "The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation." J Biol Chem **277**(33): 29792-29802.

Kim, J., S. Ahn, K. Rajagopal and R. J. Lefkowitz (2009). "Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **284**(18): 11953-11962.

Kim, J. E. and J. Chen (2004). "regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis." Diabetes **53**(11): 2748-2756.

Kimura, K., M. Hirano, R. Kobayashi and T. Hirano (1998). "Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro." Science **282**(5388): 487-490.

Kochiadakis, G. E., D. A. Arfanakis, M. E. Marketou, E. I. Skolidis, N. E. Igoumenidis, D. Nikitovic, A. Giaouzaki, G. Chlouverakis and P. E. Vardas (2010). "Oxidative stress changes after stent implantation: a randomized comparative study of sirolimus-eluting and bare metal stents." Int J Cardiol **142**(1): 33-37.

Koh, H., K. Jee, B. Lee, J. Kim, D. Kim, Y. H. Yun, J. W. Kim, H. S. Choi and J. Chung (1999). "Cloning and characterization of a nuclear S6 kinase, S6 kinase-related kinase (SRK); a novel nuclear target of Akt." Oncogene **18**(36): 5115-5119.

Kolodgie, F. D., A. P. Burke, G. Nakazawa and R. Virmani (2007). "Is Pathologic Intimal Thickening the Key to Understanding Early Plaque Progression in Human Atherosclerotic Disease?" Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **27**(5): 986-989.

Komander, D. and M. Rape (2012). "The ubiquitin code." Annu Rev Biochem **81**: 203-229.

Koo, T. H., B. A. Eipper and J. G. Donaldson (2007). "Arf6 recruits the Rac GEF Kalirin to the plasma membrane facilitating Rac activation." BMC Cell Biol **8**: 29.

Kraft, C., F. Herzog, C. Gieffers, K. Mechtler, A. Hagting, J. Pines and J. M. Peters (2003). "Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation." Embo j **22**(24): 6598-6609.

Krek, W. and E. A. Nigg (1991). "Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates." The EMBO Journal **10**(11): 3331.

Krupina, K., C. Kleiss, T. Metzger, S. Fournane, S. Schmucker, K. Hofmann, B. Fischer, N. Paul, I. M. Porter, W. Raffelsberger, O. Poch, J. R. Swedlow, L. Brino and I. Sumara (2016). "Ubiquitin Receptor Protein UBASH3B Drives Aurora B Recruitment to Mitotic Microtubules." Dev Cell **36**(1): 63-78.

Kulukian, A., J. S. Han and D. W. Cleveland (2009). "Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding." Dev Cell **16**(1): 105-117.

Kumar, V. and A. W. Cowley (2017). "Inhibition of mTORC1 signaling pathway attenuates the salt-induced hypertension in Dahl SS rats." The FASEB Journal **31**(1 Supplement): 855.815.

Kunz, J., R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N. R. Movva and M. N. Hall (1993). "Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression." Cell **73**(3): 585-596.

Kwon, T., D. Y. Kwon, J. Chun, J. H. Kim and S. S. Kang (2000). "Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1." J Biol Chem **275**(1): 423-428.

Kyaw, M., M. Yoshizumi, K. Tsuchiya, K. Kirima and T. Tamaki (2001). "Original Articles-Experimental studies-Antioxidants Inhibit JNK and p38 MAPK Activation but not ERK 1/2 Activation by Angiotensin II in Rat Aortic Smooth Muscle Cells." Hypertension Research-Clinical and Experimental **24**(3): 251-262.

Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation." Physiological Reviews **81**(2): 807-869.

Laplante, M. and David M. Sabatini (2012). "mTOR Signaling in Growth Control and Disease." Cell **149**(2): 274-293.

Lara-Gonzalez, P., M. I. Scott, M. Diez, O. Sen and S. S. Taylor (2011). "BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner." J Cell Sci **124**(Pt 24): 4332-4345.

Lassegue, B., D. Sorescu, K. Szocs, Q. Yin, M. Akers, Y. Zhang, S. L. Grant, J. D. Lambeth and K. K. Griendling (2001). "Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways." Circ Res **88**(9): 888-894.

Lavoie, J. N., G. L'Allemain, A. Brunet, R. Muller and J. Pouyssegur (1996). "Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway." J Biol Chem **271**(34): 20608-20616.

Lawler, S., Y. Fleming, M. Goedert and P. Cohen (1998). "Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro." Curr Biol **8**(25): 1387-1390.

Lee-Fruman, K. K., C. J. Kuo, J. Lippincott, N. Terada and J. Blenis (1999). "Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1." Oncogene **18**(36): 5108-5114.

Lehoux, S. and A. Tedgui (1998). "Signal Transduction of Mechanical Stresses in the Vascular Wall." Hypertension **32**(2): 338-345.

Lenormand, P., C. Sardet, G. Pagès, G. L'Allemain, A. Brunet and J. Pouyssegur (1993). "Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts." The Journal of Cell Biology **122**(5): 1079-1088.

Leon, M. B., D. E. Kandzari, E. L. Eisenstein, K. J. Anstrom, L. Mauri, D. E. Cutlip, E. Nikolsky, C. O'Shaughnessy, P. A. Overlie and A. J. Kirtane (2009). "Late safety, efficacy,

and cost-effectiveness of a zotarolimus-eluting stent compared with a paclitaxel-eluting stent in patients with de novo coronary lesions: 2-year follow-up from the ENDEAVOR IV trial (Randomized, Controlled Trial of the Medtronic Endeavor Drug [ABT-578] Eluting Coronary Stent System Versus the Taxus Paclitaxel-Eluting Coronary Stent System in De Novo Native Coronary Artery Lesions)." JACC: Cardiovascular Interventions **2**(12): 1208-1218.

Lepore, J. J., T. P. Cappola, P. A. Mericko, E. E. Morrissey and M. S. Parmacek (2005). "GATA-6 regulates genes promoting synthetic functions in vascular smooth muscle cells." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **25**(2): 309-314.

Leserer, M., A. Gschwind and A. Ullrich (2000). "Epidermal growth factor receptor signal transactivation." IUBMB Life **49**(5): 405-409.

Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the Pathogenesis of Disease." Cell **132**(1): 27-42.

Li, S., W. Ogawa, A. Emi, K. Hayashi, Y. Senga, K. Nomura, K. Hara, D. Yu and M. Kasuga (2011). "Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver." Biochem Biophys Res Commun **412**(2): 197-202.

Lim, S. and P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." Development **140**(15): 3079-3093.

Lin, C. Y., M. L. Madsen, F. R. Yarm, Y. J. Jang, X. Liu and R. L. Erikson (2000). "Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12589-12594.

Linder, M. E. and R. J. Deschenes (2007). "Palmitoylation: policing protein stability and traffic." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 74-84.

Lindon, C. and J. Pines (2004). "Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells." J Cell Biol **164**(2): 233-241.

Littlepage, L. E., H. Wu, T. Andresson, J. K. Deanehan, L. T. Amundadottir and J. V. Ruderman (2002). "Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(24): 15440-15445.

Litvak, V., R. Argov, N. Dahan, S. Ramachandran, R. Amarilio, A. Shainskaya and S. Lev (2004). "Mitotic phosphorylation of the peripheral Golgi protein Nir2 by Cdk1 provides a docking mechanism for Plk1 and affects cytokinesis completion." Mol Cell **14**(3): 319-330.

Liu, D., G. Vader, M. J. Vromans, M. A. Lampson and S. M. Lens (2009). "Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates." Science **323**(5919): 1350-1353.

Liu, D., M. Vleugel, C. B. Backer, T. Hori, T. Fukagawa, I. M. Cheeseman and M. A. Lampson (2010). "Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase." The Journal of Cell Biology **188**(6): 809-820.

Lowe, M., C. Rabouille, N. Nakamura, R. Watson, M. Jackman, E. Jamsa, D. Rahman, D. J. Pappin and G. Warren (1998). "Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis." Cell **94**(6): 783-793.

Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg (1998). "Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes." Mol Cell Biol **18**(2): 753-761.

Lundstam, U., U. Hagg, Y. B. Sverrisdottir, L. E. Svensson and L. M. Gan (2007). "Epidermal growth factor levels are related to diastolic blood pressure and carotid artery stiffness." Scand Cardiovasc J **41**(5): 308-312.

Luo, X., Z. Tang, J. Rizo and H. Yu (2002). "The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20." Mol Cell **9**(1): 59-71.

Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.

Ma, J., Y. Xue, W. Liu, C. Yue, F. Bi, J. Xu, J. Zhang, Y. Li, C. Zhong and Y. Chen (2013). "Role of activated Rac1/Cdc42 in mediating endothelial cell proliferation and tumor angiogenesis in breast cancer." PLoS One **8**(6): e66275.

Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and P. P. Pandolfi (2005). "Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis." Cell **121**(2): 179-193.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.

Maerki, S., M. H. Olma, T. Staubli, P. Steigemann, D. W. Gerlich, M. Quadroni, I. Sumara and M. Peter (2009). "The Cul3–KLHL21 E3 ubiquitin ligase targets Aurora B to midzone microtubules in anaphase and is required for cytokinesis." The Journal of Cell Biology **187**(6): 791-800.

Magidson, V., C. B. O'Connell, J. Loncarek, R. Paul, A. Mogilner and A. Khodjakov (2011). "The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly." Cell **146**(4): 555-567.

Makki, N., K. W. Thiel and F. J. Miller, Jr. (2013). "The epidermal growth factor receptor and its ligands in cardiovascular disease." Int J Mol Sci **14**(10): 20597-20613.

Makyio, H., M. Ohgi, T. Takei, S. Takahashi, H. Takatsu, Y. Katoh, A. Hanai, T. Ueda, Y. Kanaho, Y. Xie, H. W. Shin, H. Kamikubo, M. Kataoka, M. Kawasaki, R. Kato, S. Wakatsuki and K. Nakayama (2012). "Structural basis for Arf6–MKLP1 complex formation on the Flemming body responsible for cytokinesis." The EMBO Journal **31**(11): 2590-2603.

Malliri, A., S. van Es, S. Huveneers and J. G. Collard (2004). "The Rac Exchange Factor Tiam1 Is Required for the Establishment and Maintenance of Cadherin-based Adhesions." Journal of Biological Chemistry **279**(29): 30092-30098.

Malumbres, M. (2011). "Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases." Physiological Reviews **91**(3): 973-1007.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "Milestones in cell division : To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." Nat Rev Cancer **1**(3): 222-231.

Malumbres, M., E. Harlow, T. Hunt, T. Hunter, J. M. Lahti, G. Manning, D. O. Morgan, L.-H. Tsai and D. J. Wolgemuth (2009). "Cyclin-dependent kinases: a family portrait." Nature cell biology **11**(11): 1275-1276.

Manning, B. D., A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis and L. C. Cantley (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." Mol Cell **10**(1): 151-162.

Marchetti, F. and S. Venkatachalam (2010). "The multiple roles of Bub1 in chromosome segregation during mitosis and meiosis." Cell Cycle **9**(1): 58-63.

Margottin-Goguet, F., J. Y. Hsu, A. Loktev, H. M. Hsieh, J. D. Reimann and P. K. Jackson (2003). "Prophase destruction of Emil by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase." Dev Cell **4**(6): 813-826.

Marques, S., J. Fonseca, P. M. Silva and H. Bousbaa (2015). "Targeting the spindle assembly checkpoint for breast cancer treatment." Curr Cancer Drug Targets **15**(4): 272-281.

Martina, J. A., Y. Chen, M. Gucek and R. Puertollano (2012). "MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB." Autophagy **8**(6): 903-914.

Martinet, W., H. De Loof and G. R. De Meyer (2014). "mTOR inhibition: a promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques." Atherosclerosis **233**(2): 601-607.

Marx, S. O., T. Jayaraman, L. O. Go and A. R. Marks (1995). "Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells." Circulation research **76**(3): 412-417.

Marx, S. O., H. Totary-Jain and A. R. Marks (2011). "Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Restenosis." Circulation: Cardiovascular Interventions **4**(1): 104-111.

Mayer, C., J. Zhao, X. Yuan and I. Grummt (2004). "mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability." Genes Dev **18**(4): 423-434.

McCubrey, J. A., M. M. Lahair and R. A. Franklin (2006). "Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1775-1789.

McEwen, B. F., A. B. Heagle, G. O. Cassels, K. F. Buttle and C. L. Rieder (1997). "Kinetochore Fiber Maturation in PtK₁ Cells and Its Implications for the Mechanisms of Chromosome Congression and Anaphase Onset." The Journal of Cell Biology **137**(7): 1567-1580.

McGowan, C. H. and P. Russell (1993). "Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15." The EMBO journal **12**(1): 75.

McNamara, C., I. Sarembock, L. Gimple, J. Fenton 2nd, S. Coughlin and G. Owens (1993). "Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor." Journal of Clinical Investigation **91**(1): 94.

Mehta, P. K. and K. K. Griendling (2007). "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C82-97.

Meijer, L., D. Arion, R. Golsteyn, J. Pines, L. Brizuela, T. Hunt and D. Beach (1989). "Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase." Embo j **8**(8): 2275-2282.

Melaragno, M. G., D. A. Wuthrich, V. Poppa, D. Gill, V. Lindner, B. C. Berk and M. A. Corson (1998). "Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats." Circulation research **83**(7): 697-704.

Meloche, S. and J. Pouyssegur (2007). "The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition." Oncogene **26**(22): 3227-3239.

Mendez, J. I., W. J. Nicholson and W. R. Taylor (2005). "SOD isoforms and signaling in blood vessels: evidence for the importance of ROS compartmentalization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 887-888.

Mifune, M., H. Ohtsu, H. Suzuki, H. Nakashima, E. Brailoiu, N. J. Dun, G. D. Frank, T. Inagami, S. Higashiyama, W. G. Thomas, A. D. Eckhart, P. J. Dempsey and S. Eguchi (2005). "G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor." J Biol Chem **280**(28): 26592-26599.

Minden, A., A. Lin, F. X. Claret, A. Abo and M. Karin (1995). "Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs." Cell **81**(7): 1147-1157.

Miserey-Lenkei, S., A. Couëdel-Courteille, E. Del Nery, S. Bardin, M. Piel, V. Racine, J. B. Sibarita, F. Perez, M. Bornens and B. Goud (2006). "A role for the Rab6A' GTPase in the inactivation of the Mad2-spindle checkpoint." The EMBO Journal **25**(2): 278-289.

Mizukami, Y., K. Yoshioka, S. Morimoto and K.-i. Yoshida (1997). "A Novel Mechanism of JNK1 Activation: NUCLEAR TRANSLOCATION AND ACTIVATION OF JNK1 DURING ISCHEMIA AND REPERFUSION." Journal of Biological Chemistry **272**(26): 16657-16662.

Mochida, S., S. L. Maslen, M. Skehel and T. Hunt (2010). "Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis." Science **330**(6011): 1670-1673.

Monnier, A., R. Bellé, J. Morales, P. Cormier, S. Boulben and O. Mulner-Lorillon (2001). "Evidence for regulation of protein." Nucleic Acids Res **29**(7): 1453-1457.

Montagnoli, A., B. Valsasina, D. Brotherton, S. Troiani, S. Rainoldi, P. Tenca, A. Molinari and C. Santocanale (2006). "Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase-regulating kinases." J Biol Chem **281**(15): 10281-10290.

Montezano, A. C. and R. M. Touyz (2014). "Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research." Antioxid Redox Signal **20**(1): 164-182.

Moore, C. A., S. K. Milano and J. L. Benovic (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 451-482.

Moore, J. D. (2013). "In the wrong place at the wrong time: does cyclin mislocalization drive oncogenic transformation?" Nat Rev Cancer **13**(3): 201-208.

MOORE, K. A., R. SETHI, A. M. DOANES, T. M. JOHNSON, J. B. PRACYK, M. KIRBY, K. IRANI, P. J. GOLDSCHMIDT-CLERMONT and T. FINKEL (1997). "Rac1 is required for cell proliferation and G2/M progression." Biochemical Journal **326**(1): 17-20.

Morice, M.-C., P. W. Serruys, J. E. Sousa, J. Fajadet, E. Ban Hayashi, M. Perin, A. Colombo, G. Schuler, P. Barragan and G. Guagliumi (2002). "A randomized comparison of a

sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization." New England Journal of Medicine **346**(23): 1773-1780.

Mossessova, E., R. A. Corpina and J. Goldberg (2003). "Crystal structure of ARF1•Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism." Molecular cell **12**(6): 1403-1411.

Mulvany, M. J., G. L. Baumbach, C. Aalkjaer, A. M. Heagerty, N. Korsgaard, E. L. Schiffrin and D. D. Heistad (1996). "Vascular remodeling." Hypertension **28**(3): 505-506.

Murphy, L. O., S. Smith, R. H. Chen, D. C. Fingar and J. Blenis (2002). "Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products." Nat Cell Biol **4**(8): 556-564.

Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 379-393.

Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 379-393.

Myung, S.-K., W. Ju, B. Cho, S.-W. Oh, S. M. Park, B.-K. Koo and B.-J. Park (2013). "Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials." BMJ : British Medical Journal **346**.

Nagareddy, P. R., K. M. MacLeod and J. H. McNeill (2010). "GPCR agonist-induced transactivation of the EGFR upregulates MLC II expression and promotes hypertension in insulin-resistant rats." Cardiovasc Res **87**(1): 177-186.

Naik, E. and V. M. Dixit (2011). "Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production." J Exp Med **208**(3): 417-420.

Nakajima, H., F. Toyoshima-Morimoto, E. Taniguchi and E. Nishida (2003). "Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate*." Journal of Biological Chemistry **278**(28): 25277-25280.

Navarro-Lerida, I., S. Sanchez-Perales, M. Calvo, C. Rentero, Y. Zheng, C. Enrich and M. A. Del Pozo (2012). "A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization." Embo j **31**(3): 534-551.

Negre-Salvayre, A., N. Auge, V. Ayala, H. Basaga, J. Boada, R. Brenke, S. Chapple, G. Cohen, J. Feher and T. Grune (2010). "Pathological aspects of lipid peroxidation." Free radical research **44**(10): 1125-1171.

Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." Nature reviews Molecular cell biology **2**(1): 21-32.

Nissen, M. S., T. A. Langan and R. Reeves (1991). "Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of high mobility group I nonhistone chromatin protein." J Biol Chem **266**(30): 19945-19952.

Nissen, S. E., S. J. Nicholls, I. Sipahi, P. Libby, J. S. Raichlen, C. M. Ballantyne, J. Davignon, R. Erbel, J. C. Fruchart, J. C. Tardif, P. Schoenhagen, T. Crowe, V. Cain, K. Wolski, M. Goormastic and E. M. Tuzcu (2006). "Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial." JAMA **295**(13): 1556-1565.

Ohtsu, H., P. J. Dempsey and S. Eguchi (2006). "ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors." Am J Physiol Cell Physiol **291**(1): C1-10.

Oksala, N., M. Levula, N. Airla, M. Peltto-Huikko, R. M. Ortiz, O. Jarvinen, J. P. Salenius, B. Ozsait, E. Komurcu-Bayrak, N. Erginel-Unaltuna, A. P. Huovila, L. Kytomaki, J. T. Soini, M. Kahonen, P. J. Karhunen, R. Laaksonen and T. Lehtimaki (2009). "ADAM-9, ADAM-15, and ADAM-17 are upregulated in macrophages in advanced human atherosclerotic plaques in aorta and carotid and femoral arteries--Tampere vascular study." Ann Med **41**(4): 279-290.

Okuyama, H., P. H. Langsjoen, T. Hamazaki, Y. Ogushi, R. Hama, T. Kobayashi and H. Uchino (2015). "Statins stimulate atherosclerosis and heart failure: pharmacological mechanisms." Expert Rev Clin Pharmacol **8**(2): 189-199.

Olson, C. M., M. N. Hedrick, H. Izadi, T. C. Bates, E. R. Olivera and J. Anguita (2007). "p38 mitogen-activated protein kinase controls NF-kappaB transcriptional activation and tumor necrosis factor alpha production through RelA phosphorylation mediated by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 in response to *Borrelia burgdorferi* antigens." Infect Immun **75**(1): 270-277.

Olson, N., S. Chao, V. Lindner and M. Reidy (1992). "Intimal smooth muscle cell proliferation after balloon catheter injury. The role of basic fibroblast growth factor." The American journal of pathology **140**(5): 1017.

Overland, A. C. and P. A. Insel (2015). "Heterotrimeric G proteins directly regulate MMP14/membrane type-1 matrix metalloprotease: a novel mechanism for GPCR-EGFR transactivation." J Biol Chem **290**(16): 9941-9947.

Page, K., J. Li, J. A. Hodge, P. T. Liu, T. L. Vanden Hoek, L. B. Becker, R. G. Pestell, M. R. Rosner, M. B. Hershenson and ** (1999). "Characterization of a Rac1 Signaling Pathway to Cyclin D1 Expression in Airway Smooth Muscle Cells." Journal of Biological Chemistry **274**(31): 22065-22071.

Palacios, F. and C. D'Souza-Schorey (2003). "Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering." Journal of Biological Chemistry **278**(19): 17395-17400.

Pardo, O. E. and M. J. Seckl (2013). "S6K2: The Neglected S6 Kinase Family Member." Front Oncol **3**.

Pastore, C. J., J. M. Isner, P. A. Bacha, M. Kearney and J. G. Pickering (1995). "Epidermal growth factor receptor-targeted cytotoxin inhibits neointimal hyperplasia in vivo. Results of local versus systemic administration." Circ Res **77**(3): 519-529.

Pavletich, N. P. (1999). "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors 1, 2." Journal of molecular biology **287**(5): 821-828.

Pawson, T., G. D. Gish and P. Nash (2001). "SH2 domains, interaction modules and cellular wiring." Trends Cell Biol **11**(12): 504-511.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.

Pesin, J. A. and T. L. Orr-Weaver (2008). "Regulation of APC/C Activators in Mitosis and Meiosis." Annu Rev Cell Dev Biol **24**: 475-499.

Peters, J.-M. (2006). "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 644-656.

Peters, J. M. (2006). "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 644-656.

Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck and D. M. Sabatini (2011). "mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway." Cell **146**(3): 408-420.

Petronczki, M., M. Glotzer, N. Kraut and J. M. Peters (2007). "Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle." Dev Cell **12**(5): 713-725.

Peyroche, A., B. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils and C. L. Jackson (1999). "Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF–GDP–Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain." Molecular cell **3**(3): 275-285.

Pfleger, C. M. and M. W. Kirschner (2000). "The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1." Genes Dev **14**(6): 655-665.

Phong, M. S., R. D. Van Horn, S. Li, G. Tucker-Kellogg, U. Surana and X. S. Ye (2010). "p38 mitogen-activated protein kinase promotes cell survival in response to DNA damage but is not required for the G(2) DNA damage checkpoint in human cancer cells." Mol Cell Biol **30**(15): 3816-3826.

Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-533.

Pillai, M. S., S. Sapna and K. Shivakumar (2011). "p38 MAPK regulates G1-S transition in hypoxic cardiac fibroblasts." Int J Biochem Cell Biol **43**(6): 919-927.

Pinzar, E., T. Wang, M. R. Garrido, W. Xu, P. Levy and S. P. Bottari (2005). "Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells." FEBS letters **579**(22): 5100-5104.

Pollman, M. J., T. Yamada, M. Horiuchi and G. H. Gibbons (1996). "Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II." Circulation Research **79**(4): 748-756.

Porras, A., S. Zuluaga, E. Black, A. Valladares, A. M. Alvarez, C. Ambrosino, M. Benito and A. R. Nebreda (2004). "P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli." Mol Biol Cell **15**(2): 922-933.

Porstmann, T., C. R. Santos, B. Griffiths, M. Cully, M. Wu, S. Leever, J. R. Griffiths, Y. L. Chung and A. Schulze (2008). "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth." Cell Metab **8**(3): 224-236.

Poupart, M. E., D. Fessart, M. Cotton, S. A. Laporte and A. Claing (2007). "ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin." Cell Signal **19**(11): 2370-2378.

Prinz, S., E. S. Hwang, R. Visintin and A. Amon (1998). "The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis." Curr Biol **8**(13): 750-760.

Puxeddu, E., M. Uhart, C. C. Li, F. Ahmad, G. Pacheco-Rodriguez, V. C. Manganiello, J. Moss and M. Vaughan (2009). "Interaction of phosphodiesterase 3A with brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins BIG1 and BIG2 and effect on ARF1 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(15): 6158-6163.

Qiao, X., L. Zhang, A. M. Gamper, T. Fujita and Y. Wan (2010). "APC/C-Cdh1: from cell cycle to cellular differentiation and genomic integrity." Cell Cycle **9**(19): 3904-3912.

Radhakrishna, H., O. Al-Awar, Z. Khachikian and J. G. Donaldson (1999). "ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements." J Cell Sci **112** (Pt 6): 855-866.

Radhakrishna, H., R. D. Klausner and J. G. Donaldson (1996). "Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase." J Cell Biol **134**(4): 935-947.

Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-7426.

Rajagopalan, S., S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling and D. G. Harrison (1996). "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone." J Clin Invest **97**(8): 1916-1923.

Raman, M., W. Chen and M. H. Cobb (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." Oncogene **26**(22): 3100-3112.

Ramírez-Valle, F., M. L. Badura, S. Braunstein, M. Narasimhan and R. J. Schneider (2010). "Mitotic Raptor Promotes mTORC1 Activity, G2/M Cell Cycle Progression, and Internal Ribosome Entry Site-Mediated mRNA Translation." Molecular and Cellular Biology **30**(13): 3151-3164.

Rao, G. N. (1996). "Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases." Oncogene **13**(4): 713-719.

Reimann, J. D., E. Freed, J. Y. Hsu, E. R. Kramer, J. M. Peters and P. K. Jackson (2001). "Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." Cell **105**(5): 645-655.

Reimann, J. D., B. E. Gardner, F. Margottin-Goguet and P. K. Jackson (2001). "Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins." Genes Dev **15**(24): 3278-3285.

Reinhard, C., A. Fernandez, N. J. Lamb and G. Thomas (1994). "Nuclear localization of p85s6k: functional requirement for entry into S phase." Embo j **13**(7): 1557-1565.

Renault, L., B. Guibert and J. Cherfils (2003). "Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor." Nature **426**(6966): 525-530.

Robinson, D. R., Y. M. Wu and S. F. Lin (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene **19**(49): 5548-5557.

Rocks, O., M. Gerauer, N. Vartak, S. Koch, Z. P. Huang, M. Pechlivanis, J. Kuhlmann, L. Brunsveld, A. Chandra, B. Ellinger, H. Waldmann and P. I. Bastiaens (2010). "The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins." Cell **141**(3): 458-471.

Ronkina, N., A. Kotlyarov and M. Gaestel (2008). "MK2 and MK3--a pair of isoenzymes?" Front Biosci **13**: 5511-5521.

Rosen, E. M., D. Grant, H. Kleinman, I. Goldberg, M. Bhargava, B. J. Nickoloff, J. L. Kinsella and P. Polverini (1992). Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor in vivo. Symposia of the Society for Experimental Biology.

Rosenbluth, J. M., D. J. Mays, M. F. Pino, L. J. Tang and J. A. Pietenpol (2008). "A gene signature-based approach identifies mTOR as a regulator of p73." Mol Cell Biol **28**(19): 5951-5964.

Roshak, A. K., E. A. Capper, C. Imburgia, J. Fornwald, G. Scott and L. A. Marshall (2000). "The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase." Cell Signal **12**(6): 405-411.

Rossman, K. L., C. J. Der and J. Sodek (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nature reviews Molecular cell biology **6**(2): 167-180.

Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt and A. R. Nebreda (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-1037.

Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi and J. Blenis (2004). "Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13489-13494.

Royle, S. J., N. A. Bright and L. Lagnado (2005). "Clathrin is required for the function of the mitotic spindle." Nature **434**(7037): 1152-1157.

Ruchaud, S., M. Carmena and W. C. Earnshaw (2007). "Chromosomal passengers: conducting cell division." Nature reviews Molecular cell biology **8**(10): 798-812.

Rudner, A. D. and A. W. Murray (2000). "Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex." J Cell Biol **149**(7): 1377-1390.

Ruygrok, P. N., M. Desaga, F. Van Den Branden, K. Rasmussen, H. Suryapranata, C. Dorange, S. Veldhof and P. W. Serruys (2007). "One year clinical follow-up of the XIENCE V Everolimus-eluting stent system in the treatment of patients with de novo native coronary artery lesions: the SPIRIT II study." EuroIntervention: journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology **3**(3): 315-320.

Sabapathy, K., K. Hochedlinger, S. Y. Nam, A. Bauer, M. Karin and E. F. Wagner (2004). "Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation." Mol Cell **15**(5): 713-725.

Sabe, H., S. Hashimoto, M. Morishige, E. Ogawa, A. Hashimoto, J. M. Nam, K. Miura, H. Yano and Y. Onodera (2009). "The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis." Traffic **10**(8): 982-993.

Salon, J. A., D. T. Lodowski and K. Palczewski (2011). "The Significance of G Protein-Coupled Receptor Crystallography for Drug Discovery." Pharmacological Reviews **63**(4): 901-937.

Sancak, Y., L. Bar-Peled, R. Zoncu, A. L. Markhard, S. Nada and D. M. Sabatini (2010). "Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids." Cell **141**(2): 290-303.

Santamaria, A., R. Neef, U. Eberspächer, K. Eis, M. Husemann, D. Mumberg, S. Prechtel, V. Schulze, G. Siemeister, L. Wortmann, F. A. Barr and E. A. Nigg (2007). "Use of the Novel Plk1 Inhibitor ZK-Thiazolidinone to Elucidate Functions of Plk1 in Early and Late Stages of Mitosis." Molecular Biology of the Cell **18**(10): 4024-4036.

Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres and M. Barbacid (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." Nature **448**(7155): 811-815.

Santy, L. C. and J. E. Casanova (2001). "Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D." J Cell Biol **154**(3): 599-610.

Santy, L. C., K. S. Ravichandran and J. E. Casanova (2005). "The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1." Current biology **15**(19): 1749-1754.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard and D. M. Sabatini (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." Mol Cell **22**(2): 159-168.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.

Sarkar, D., Z. Z. Su, I. V. Lebedeva, M. Sauane, R. V. Gopalkrishnan, K. Valerie, P. Dent and P. B. Fisher (2002). "mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10054-10059.

Schindler, C., A. Mueller, P. Bramlage, W. Boecking, W. Kirch and J. Schweizer (2007). "Comparison of selective AT1-receptor blockade versus ACE inhibition for restenosis prophylaxis in patients with peripheral occlusive arterial disease after stent angioplasty: a randomized, controlled, proof-of-concept study." Angiology **58**(6): 710-716.

Schlacht, A., K. Mowbrey, M. Elias, R. A. Kahn and J. B. Dacks (2013). "Ancient complexity, opisthokont plasticity, and discovery of the 11th subfamily of Arf GAP proteins." Traffic **14**(6): 636-649.

Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-225.

Schmalzigaug, R., M. L. Garron, J. Tyler Roseman, Y. Xing, C. E. Davidson, S. T. Arold and R. T. Premont (2007). "GIT1 Utilizes a Focal Adhesion Targeting-Homology Domain to Bind Paxillin." Cell Signal **19**(8): 1733-1744.

Schmitz, U., K. Thömmes, I. Beier, W. Wagner, A. Sachinidis, R. Düsing and H. Vetter (2001). "Angiotensin II-induced Stimulation of p21-activated Kinase and c-Jun NH2-terminal Kinase Is Mediated by Rac1 and Nck." Journal of Biological Chemistry **276**(25): 22003-22010.

Schreier, B., M. Gekle and C. Grossmann (2014). "Role of epidermal growth factor receptor in vascular structure and function." Curr Opin Nephrol Hypertens **23**(2): 113-121.

Schwartz, S. M., G. R. Campbell and J. H. Campbell (1986). "Replication of smooth muscle cells in vascular disease." Circulation Research **58**(4): 427-444.

Schweitzer, J. K., E. E. Burke, H. V. Goodson and C. D'Souza-Schorey (2005). "Endocytosis Resumes during Late Mitosis and Is Required for Cytokinesis." Journal of Biological Chemistry **280**(50): 41628-41635.

Schweitzer, J. K. and C. D'Souza-Schorey (2002). "Localization and activation of the ARF6 GTPase during cleavage furrow ingression and cytokinesis." J Biol Chem **277**(30): 27210-27216.

Sciarretta, S., P. Zhai, D. Shao, Y. Maejima, J. Robbins, M. Volpe, G. Condorelli and J. Sadoshima (2012). "Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome." Circulation **125**(9): 1134-1146.

Seki, A., J. A. Coppinger, C.-Y. Jang, J. R. Yates and G. Fang (2008). "Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry." Science **320**(5883): 1655-1658.

Seshiah, P. N., D. S. Weber, P. Rocic, L. Valppu, Y. Taniyama and K. K. Griendling (2002). "Angiotensin II stimulation of NAD (P) H oxidase activity." Circulation research **91**(5): 406-413.

Shah, O. J., S. Ghosh and T. Hunter (2003). "Mitotic Regulation of Ribosomal S6 Kinase 1 Involves Ser/Thr, Pro Phosphorylation of Consensus and Non-consensus Sites by Cdc2." Journal of Biological Chemistry **278**(18): 16433-16442.

Shanmugam, S., P. Corvol and J.-M. Gasc (1996). "Angiotensin II Type 2 Receptor mRNA Expression in the Developing Cardiopulmonary System of the Rat." Hypertension **28**(1): 91-97.

Shanmugam, S., C. Llorens-Cortes, E. Clauser, P. Corvol and J. M. Gasc (1995). "Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland." American Journal of Physiology - Renal Physiology **268**(5): F922-F930.

Shaulian, E. and M. Karin (2001). "AP-1 in cell proliferation and survival." Oncogene **20**(19): 2390-2400.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes & development **13**(12): 1501-1512.

Shibata, K., H. Sakai, Q. Huang, H. Kamata, Y. Chiba, M. Misawa, R. Ikebe and M. Ikebe (2015). "Rac1 regulates myosin II phosphorylation through regulation of myosin light chain phosphatase." J Cell Physiol **230**(6): 1352-1364.

Shiozaki, A. A., T. Senra, A. T. Morikawa, D. F. Deus, A. T. Paladino, I. M. F. Pinto and R. C. Maranhão (2016). "Treatment of patients with aortic atherosclerotic disease with paclitaxel-associated lipid nanoparticles." Clinics (Sao Paulo) **71**(8): 435-439.

Shome, K., Y. Nie and G. Romero (1998). "ADP-ribosylation Factor Proteins Mediate Agonist-induced Activation of Phospholipase D." Journal of Biological Chemistry **273**(46): 30836-30841.

Shor, B., J. Wu, Q. Shakey, L. Toral-Barza, C. Shi, M. Follettie and K. Yu (2010). "Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells." J Biol Chem **285**(20): 15380-15392.

Shuda, M., C. Velasquez, E. Cheng, D. G. Cordek, H. J. Kwun, Y. Chang and P. S. Moore (2015). "CDK1 substitutes for mTOR kinase to activate mitotic cap-dependent protein translation." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(19): 5875-5882.

Simon, A. R., U. Rai, B. L. Fanburg and B. H. Cochran (1998). "Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species." American Journal of Physiology - Cell Physiology **275**(6): C1640-C1652.

Simon, M. I., M. P. Strathmann and N. Gautam (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." Science **252**(5007): 802-808.

Sironi, L., M. Mapelli, S. Knapp, A. De Antoni, K. T. Jeang and A. Musacchio (2002). "Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint." Embo j **21**(10): 2496-2506.

Smith, E. M., S. G. Finn, A. R. Tee, G. J. Browne and C. G. Proud (2005). "The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses." J Biol Chem **280**(19): 18717-18727.

Song, L. and M. Rape (2010). "Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex." Mol Cell **38**(3): 369-382.

Standley, P. R., T. J. Obards and C. L. Martina (1999). "Cyclic stretch regulates autocrine IGF-I in vascular smooth muscle cells: implications in vascular hyperplasia." American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism **276**(4): E697-E705.

Stanley, A., K. Thompson, A. Hynes, C. Brakebusch and F. Quondamatteo (2014). "NADPH oxidase complex-derived reactive oxygen species, the actin cytoskeleton, and Rho GTPases in cell migration." Antioxid Redox Signal **20**(13): 2026-2042.

Strydom, H. C. (1990). "The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life." European Heart Journal **11**(suppl E): 3-19.

Steigemann, P., C. Wurzenberger, M. H. Schmitz, M. Held, J. Guizetti, S. Maar and D. W. Gerlich (2009). "Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization." Cell **136**(3): 473-484.

Steinhubl, S. R. (2008). "Why Have Antioxidants Failed in Clinical Trials?" The American Journal of Cardiology **101**(10, Supplement): S14-S19.

Steward, D. L., J. R. Shaeffer and R. M. Humphrey (1968). "Breakdown and Assembly of Polyribosomes in Synchronized Chinese Hamster Cells." Science **161**(3843): 791-793.

Stewart, S. and G. Fang (2005). "Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1." Cancer Res **65**(19): 8730-8735.

Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-1478.

Stone, G. W., S. G. Ellis, D. A. Cox, J. Hermiller, C. O'Shaughnessy, J. T. Mann, M. Turco, R. Caputo, P. Bergin and J. Greenberg (2004). "A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease." New England Journal of Medicine **350**(3): 221-231.

Sudakin, V., G. K. Chan and T. J. Yen (2001). "Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2." J Cell Biol **154**(5): 925-936.

Sugamura, K. and J. F. Keaney, Jr. (2011). "Reactive oxygen species in cardiovascular disease." Free Radic Biol Med **51**(5): 978-992.

Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A. B. Chung, K. K. Griendling and J. D. Lambeth (1999). "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1." Nature **401**(6748): 79-82.

Sumara, I., J. F. Gimenez-Abian, D. Gerlich, T. Hirota, C. Kraft, C. de la Torre, J. Ellenberg and J. M. Peters (2004). "Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles." Curr Biol **14**(19): 1712-1722.

Sumara, I., M. Quadroni, C. Frei, M. H. Olma, G. Sumara, R. Ricci and M. Peter (2007). "A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells." Dev Cell **12**(6): 887-900.

Sumara, I., E. Vorlaufer, P. T. Stukenberg, O. Kelm, N. Redemann, E. A. Nigg and J. M. Peters (2002). "The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase." Mol Cell **9**(3): 515-525.

Suzuki, H., E. D. Motley, G. D. Frank, H. Utsunomiya and S. Eguchi (2005). "Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement." Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents **3**(4): 305-322.

Szöcs, K., B. Lassègue, D. Sorescu, L. L. Hilenski, L. Valppu, T. L. Couse, J. N. Wilcox, M. T. Quinn, J. D. Lambeth and K. K. Griendling (2002). "Upregulation of nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **22**(1): 21-27.

Taguchi, S., K. Honda, K. Sugiura, A. Yamaguchi, K. Furukawa and T. Urano (2002). "Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1." FEBS Lett **519**(1-3): 59-65.

Tague, S. E., V. Muralidharan and C. D'Souza-Schorey (2004). "ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(26): 9671-9676.

Takaguri, A., K. Kimura, A. Hinoki, A. M. Bourne, M. V. Autieri and S. Eguchi (2011). "A disintegrin and metalloprotease 17 mediates neointimal hyperplasia in vasculature." Hypertension **57**(4): 841-845.

Takenaka, K., T. Moriguchi and E. Nishida (1998). "Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest." Science **280**(5363): 599-602.

Tang, H., Q. Hao, S. A. Rutherford, B. Low and Z. J. Zhao (2005). "Inactivation of SRC family tyrosine kinases by reactive oxygen species in vivo." J Biol Chem **280**(25): 23918-23925.

Tang, H., E. Hornstein, M. Stolovich, G. Levy, M. Livingstone, D. Templeton, J. Avruch and O. Meyuhas (2001). "Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation." Mol Cell Biol **21**(24): 8671-8683.

Tang, Z., R. Bharadwaj, B. Li and H. Yu (2001). "Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1." Dev Cell **1**(2): 227-237.

Tang, Z., H. Shu, D. Oncel, S. Chen and H. Yu (2004). "Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint." Mol Cell **16**(3): 387-397.

Tardif, J.-C., J. Grégoire, L. Schwartz, L. Title, L. Laramée, F. Reeves, J. Lespérance, M. G. Bourassa, P. L. L'Allier, M. Glass, J. Lambert and M.-C. Guertin (2003). "Effects of AGI-1067 and Probucol After Percutaneous Coronary Interventions." Circulation **107**(4): 552-558.

Taylor, D. S., X. Cheng, J. E. Pawlowski, A. R. Wallace, P. Ferrer and C. J. Molloy (1999). "Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(4): 1633-1638.

Tcherkezian, J. and N. Lamarche-Vane (2007). "Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins." Biology of the Cell **99**(2): 67-86.

Tee, A. R., B. D. Manning, P. P. Roux, L. C. Cantley and J. Blenis (2003). "Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb." Curr Biol **13**(15): 1259-1268.

Teixeira, L. K. and S. I. Reed (2013). "Ubiquitin ligases and cell cycle control." Annu Rev Biochem **82**: 387-414.

Thekkumkara, T. J., R. Cookson and S. L. Linas (1998). "Angiotensin (AT1A) receptor-mediated increases in transcellular sodium transport in proximal tubule cells." Am J Physiol **274**(5 Pt 2): F897-905.

Thompson, H. M., H. Cao, J. Chen, U. Euteneuer and M. A. McNiven (2004). "Dynamitin 2 binds [gamma]-tubulin and participates in centrosome cohesion." Nat Cell Biol **6**(4): 335-342.

Tilley, D. G. (2011). "G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function." Circ Res **109**(2): 217-230.

Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell and R. J. Davis (2000). "Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway." Science **288**(5467): 870-874.

Touyz, R. M. and A. M. Briones (2011). "Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension." Hypertens Res **34**(1): 5-14.

Touyz, R. M., M. Cruzado, F. Tabet, G. Yao, S. Salomon and E. L. Schiffrin (2003). "Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation." Canadian journal of physiology and pharmacology **81**(2): 159-167.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, N. Shinya, A. Iwamatsu and E. Nishida (2001). "Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase." Nature **410**(6825): 215-220.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, N. Shinya, A. Iwamatsu and E. Nishida (2001). "Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase." Nature **410**(6825): 215-220.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi and E. Nishida (2002). "Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase." EMBO reports **3**(4): 341-348.

Trachootham, D., J. Alexandre and P. Huang (2009). "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" Nat Rev Drug Discov **8**(7): 579-591.

Tseng, L. C. and R. H. Chen (2011). "Temporal control of nuclear envelope assembly by phosphorylation of lamin B receptor." Mol Biol Cell **22**(18): 3306-3317.

Uhlmann, F., F. Lottspeich and K. Nasmyth (1999). "Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1." Nature **400**(6739): 37-42.

Ushio-Fukai, M., R. W. Alexander, M. Akers and K. K. Griendling (1998). "p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is a Critical Component of the Redox-sensitive Signaling Pathways Activated by Angiotensin II ROLE IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL HYPERTROPHY." Journal of Biological Chemistry **273**(24): 15022-15029.

Ushio-Fukai, M., R. W. Alexander, M. Akers, P. R. Lyons, B. Lassegue and K. K. Griendling (1999). "Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells." Mol Pharmacol **55**(1): 142-149.

Ushio-Fukai, M., K. K. Griendling, M. Akers, P. R. Lyons and R. W. Alexander (1998). "Temporal Dispersion of Activation of Phospholipase C- β 1 and - γ Isoforms by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells: ROLE OF α q/11, α 12, AND $\beta\gamma$ G PROTEIN SUBUNITS." Journal of Biological Chemistry **273**(31): 19772-19777.

Valente, A. J., T. Yoshida, S. N. Murthy, S. S. V. P. Sakamuri, M. Katsuyama, R. A. Clark, P. Delafontaine and B. Chandrasekar (2012). "Angiotensin II enhances AT₁-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT₁, Nox1, and interleukin-18." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **303**(3): H282-H296.

van de Weerd, B. C. M., D. R. Littler, R. Klompaker, A. Huseinovic, A. Fish, A. Perrakis and R. H. Medema (2008). "Polo-box domains confer target specificity to the Polo-like kinase family." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1783**(6): 1015-1022.

van Vugt, M. A. T. M., B. C. M. van de Weerd, G. Vader, H. Janssen, J. Calafat, R. Klompaker, R. M. F. Wolthuis and R. H. Medema (2004). "Polo-like Kinase-1 Is Required for Bipolar Spindle Formation but Is Dispensable for Anaphase Promoting Complex/Cdc20

Activation and Initiation of Cytokinesis." Journal of Biological Chemistry **279**(35): 36841-36854.

Vander Haar, E., S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D. H. Kim (2007). "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40." Nat Cell Biol **9**(3): 316-323.

Vega, F. M. and A. J. Ridley (2008). "Rho GTPases in cancer cell biology." FEBS Lett **582**(14): 2093-2101.

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." Science **294**(5545): 1299-1304.

Viedt, C., U. Soto, H. I. Krieger-Brauer, J. Fei, C. Elsing, W. Kübler and J. Kreuzer (2000). "Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **20**(4): 940-948.

Vigil, D., J. Cherfils, K. L. Rossman and C. J. Der (2010). "Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?" Nat Rev Cancer **10**(12): 842-857.

Viswanathan, M., C. Stromberg, A. Seltzer and J. M. Saavedra (1992). "Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptors in neointima of rat aorta." J Clin Invest **90**(5): 1707-1712.

Wagner, E. F. and A. R. Nebreda (2009). "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development." Nat Rev Cancer **9**(8): 537-549.

Waizenegger, I. C., S. Hauf, A. Meinke and J. M. Peters (2000). "Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase." Cell **103**(3): 399-410.

Waksman, R. and A. Steinvil (2016). "In-Stent Restenosis?" The Raiders of the Magic Remedy **9**(7).

Walczak, C. E., S. Cai and A. Khodjakov (2010). "Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(2): 91-102.

Wang, B. T., G. S. Ducker, A. J. Barczak, R. Barbeau, D. J. Erle and K. M. Shokat (2011). "The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15201-15206.

Wang, D. A. and S. M. Sebt (2005). "Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities." J Biol Chem **280**(19): 19243-19249.

Wang, L., T. E. Harris, R. A. Roth and J. C. Lawrence, Jr. (2007). "PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding." J Biol Chem **282**(27): 20036-20044.

Wang, Z., M. R. Castresana and W. H. Newman (2004). "Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells." Journal of molecular and cellular cardiology **36**(1): 49-56.

Wasch, R., J. A. Robbins and F. R. Cross (2010). "The emerging role of APC/CCdh1 in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression." Oncogene **29**(1): 1-10.

Wassmann, S., T. Czech, M. van Eickels, I. Fleming, M. Bohm and G. Nickenig (2004). "Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice." Circulation **110**(19): 3062-3067.

Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, N. Watanabe, T. Hunter and H. Osada (2004). "M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF β -TrCP." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(13): 4419-4424.

Watanabe, N., M. Broome and T. Hunter (1995). "Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle." The EMBO journal **14**(9): 1878.

Wenk, M. R. and P. De Camilli (2004). "Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: Insights from vesicle recycling in nerve

terminals." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(22): 8262-8269.

Wennerberg, K., K. L. Rossman and C. J. Der (2005). "The Ras superfamily at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 5): 843-846.

Weston, C. R. and R. J. Davis (2002). "The JNK signal transduction pathway." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 14-21.

Wettschureck, N. and S. Offermanns (2005). "Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions." Physiological Reviews **85**(4): 1159-1204.

Wetzker, R. and F. D. Bohmer (2003). "Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(8): 651-657.

Whitfield, W. G., C. Gonzalez, G. Maldonado-Codina and D. M. Glover (1990). "The A- and B-type cyclins of Drosophila are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G2-M transition." The EMBO Journal **9**(8): 2563-2572.

Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med (Berl) **74**(10): 589-607.

Wieduwilt, M. J. and M. M. Moasser (2008). "The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics." Cell Mol Life Sci **65**(10): 1566-1584.

Williamson, A., S. Banerjee, X. Zhu, I. Philipp, A. T. Iavarone and M. Rape (2011). "Regulation of ubiquitin chain initiation to control the timing of substrate degradation." Mol Cell **42**(6): 744-757.

Wittmann, T., G. M. Bokoch and C. M. Waterman-Storer (2004). "Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1." J Biol Chem **279**(7): 6196-6203.

Wong, O. K. and G. Fang (2005). "Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores." The Journal of Cell Biology **170**(5): 709-719.

Wood, C. D., T. M. Thornton, G. Sabio, R. A. Davis and M. Rincon (2009). "Nuclear Localization of p38 MAPK in Response to DNA Damage." Int J Biol Sci **5**(5): 428-437.

Wurzenberger, C. and D. W. Gerlich (2011). "Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 469-482.

Xie, X., D. Zhang, B. Zhao, M. K. Lu, M. You, G. Condorelli, C. Y. Wang and K. L. Guan (2011). "IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(16): 6474-6479.

Xiong, W. and J. E. Ferrell, Jr. (2003). "A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision." Nature **426**(6965): 460-465.

Yamada, T., M. Horiuchi and V. J. Dzau (1996). "Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(1): 156-160.

Yan, C., D. Kim, T. Aizawa and B. C. Berk (2003). "Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 26-36.

Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.

Yasuda, S., F. Ocegueda-Yanez, T. Kato, M. Okamoto, S. Yonemura, Y. Terada, T. Ishizaki and S. Narumiya (2004). "Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores." Nature **428**(6984): 767-771.

Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions." Growth Factors **24**(1): 21-44.

Yu, H. (2007). "Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine." Mol Cell **27**(1): 3-16.

Yu, H., R. W. King, J. M. Peters and M. W. Kirschner (1996). "Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation." Curr Biol **6**(4): 455-466.

Yu, K., L. Toral-Barza, C. Shi, W. G. Zhang, J. Lucas, B. Shor, J. Kim, J. Verheijen, K. Curran, D. J. Malwitz, D. C. Cole, J. Ellingboe, S. Ayral-Kaloustian, T. S. Mansour, J. J. Gibbons, R. T. Abraham, P. Nowak and A. Zask (2009). "Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin." Cancer Res **69**(15): 6232-6240.

Yudkovsky, Y., M. Shteinberg, T. Listovsky, M. Brandeis and A. Hershko (2000). "Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint." Biochem Biophys Res Commun **271**(2): 299-304.

Yusuf, S., P. Sleight, J. Pogue, J. Bosch, R. Davies and G. Dagenais (2000). "Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators." N Engl J Med **342**(3): 145-153.

Zachariae, W., M. Schwab, K. Nasmyth and W. Seufert (1998). "Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex." Science **282**(5394): 1721-1724.

Zalba, G., F. J. Beaumont, G. San Jose, A. Fortuno, M. A. Fortuno, J. C. Etayo and J. Diez (2000). "Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **35**(5): 1055-1061.

Zhang, B., Y. Zhang and E. Shacter (2004). "Rac1 Inhibits Apoptosis in Human Lymphoma Cells by Stimulating Bad Phosphorylation on Ser-75." Molecular and Cellular Biology **24**(14): 6205-6214.

Zhang, L., P. Xie, J. Wang, Q. Yang, C. Fang, S. Zhou and J. Li (2010). "Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension." J Biol Chem **285**(18): 13666-13677.

Zhang, Q., J. Calafat, H. Janssen and S. Greenberg (1999). "ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting." Mol Cell Biol **19**(12): 8158-8168.

Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." Cell Res **12**(1): 9-18.

Zhao, X., T. K. Lasell and P. Melancon (2002). "Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic." Mol Biol Cell **13**(1): 119-133.

Zhao, Z.-s., E. Manser, T.-H. Loo and L. Lim (2000). "Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly." Molecular and cellular biology **20**(17): 6354-6363.

Zheng, M., Y. H. Wang, X. N. Wu, S. Q. Wu, B. J. Lu, M. Q. Dong, H. Zhang, P. Sun, S. C. Lin, K. L. Guan and J. Han (2011). "Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1." Nat Cell Biol **13**(3): 263-272.

Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger and M. N. Hall (2011). "Activation of mTORC2 by association with the ribosome." Cell **144**(5): 757-768.

Zuo, L., M. Ushio-Fukai, L. L. Hilenski and R. W. Alexander (2004). "Microtubules regulate angiotensin II type 1 receptor and rac1 localization in caveolae/lipid rafts." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **24**(7): 1223-1228.

Zuo, L., M. Ushio-Fukai, S. Ikeda, L. Hilenski, N. Patrushev and R. W. Alexander (2005). "Caveolin-1 Is Essential for Activation of Rac1 and NAD(P)H Oxidase After Angiotensin II Type 1 Receptor Stimulation in Vascular Smooth Muscle Cells." Role in Redox Signaling and Vascular Hypertrophy **25**(9): 1824-1830.

Zuo, L., M. Ushio-Fukai, S. Ikeda, L. Hilenski, N. Patrushev and R. W. Alexander (2005). "Caveolin-1 is essential for activation of Rac1 and NAD(P)H oxidase after angiotensin II type 1 receptor stimulation in vascular smooth muscle cells: role in redox signaling and vascular hypertrophy." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(9): 1824-1830.